

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR LA VALEUR ANTIGÈNE DES PROTÉINES FORMOLÉES

par J. LOISELEUR.

(Institut Pasteur, Service de Chimie physique.)

La transformation des toxines en anatoxines sous l'action du formol pose de nombreux problèmes : la disparition de la toxicité, la conservation du pouvoir antigène et en même temps l'effet prépondérant de la concentration du formol mis en œuvre.

L'action immédiate réside évidemment dans la combinaison du formol sur les groupes aminés primaires : ce qui avait conduit plusieurs auteurs [entre autres Schmidt (1), Wadsworth et ses collaborateurs (2)] à rendre ce phénomène responsable de la transformation des toxines en anatoxines. Pourtant, en 1937, Goldie (3), expérimentant avec le cétène, avait montré que, si le pouvoir toxique est bien en liaison étroite avec les groupes aminés primaires, il est impossible, à l'aide de ce réactif, de faire disparaître complètement le pouvoir toxique sans détruire en même temps le pouvoir antigène.

De fait, la propriété anatoxigène paraît l'apanage exclusif du formol. Berthelot et Ramon (4) ont réussi à préparer des anatoxines avec des réactifs très divers, comme l'acroléine, mais possédant tous la fonction aldéhyde. Schmidt (5) a examiné 200

(1) S. SCHMIDT. *Zeitschr. Immunitätsf.* 1938, **126**, 35.

(2) A. WADSWORTH, J. J. QUIGLEY et G. R. SICKLES. *J. infect. Dis.*, 1937, **61**, 239.

(3) H. GOLDIE. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **136**, 974.

(4) A. BERTHELOT et G. RAMON. *C. R. Acad. Sci.*, 1925, **180**, 340.

(5) S. SCHMIDT. *Biochim. Zeitschr.*, 1932, **259**, 158.

corps, parmi lesquels on trouve des représentants de chaque grand groupe des composés organiques : carbures, alcools, aldéhydes, acides, sucres, amines, diverses combinaisons organiques carbo- et hétérocycliques : pas un seul de ces corps n'agit sur la toxine comme l'aldéhyde formique. Ce dernier corps est le seul dont l'action, combinée à celle de la chaleur ménagée, aboutit à la formation de l'anatoxine proprement dite. De plus, Schmidt constatait que, dans la toxine complètement détoxiquée, le taux des groupements aminés bloqués ne dépasse pas 30 p. 100.

On était donc amené à penser que l'action du formol ne se limite pas au seul blocage des fonctions amines. Velluz (6) imagina alors l'hypothèse de la condensation et de la cyclisation, en prenant comme type l'action du formol sur le tryptophane.

Certains faits expérimentaux nouveaux (7) relatifs à l'action secondaire du formol sur les acides aminés permettent de développer cette hypothèse et de préciser l'action exercée par le formol sur la valeur antigène des protéines.

I. L'ACTION SÉLECTIVE DU FORMOL SUR UN MÉLANGE D'ACIDES AMINÉS. — Rappelons d'abord que, pour les acides aminés, l'action du formol s'exerce en deux étapes successives. Dans un premier temps — la méthylénisation immédiate de Sørensen — il se forme un produit d'association, mettant en jeu pour chaque molécule d'acide aminé soit 1, soit 2 molécules de formol (8) et possédant une constante de dissociation beaucoup plus acide. Puis, sous l'influence du temps et de la chaleur, la structure du composé précédent subit une modification profonde : c'est la deuxième étape, mise en évidence par la variation du pouvoir rotatoire et par l'apparition d'une fluorescence décelable en lumière de Wood. Pour certains acides aminés (le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine), il est bien établi que l'action du formol a entraîné alors la cyclisation de la molécule. Un enroulement moléculaire analogue doit être également assigné aux acides à chaîne droite (la cystéine, la lysine, la sérine) quand ils deviennent fluorescents sous l'action du formol.

Un autre fait très important, c'est que cette action secondaire du formol est sélective, en ce sens qu'elle intéresse successivement un nombre de plus en plus considérable d'acides aminés, à mesure que l'on augmente soit la température de la réaction, soit la concentration du formol. Introduit dans un mélange d'acides aminés, le formol n'exerce pas son action secondaire d'une façon uniforme, mais au contraire proportionnellement aux affinités

(6) L. VELLUZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 35.

(7) *Soc. Chim. biol.*, séance du 16 juin 1942.

(8) C. SCHMIDT. *The chemistry of the Amino-Acids and Proteins*. Baltimore, 1939.

respectives de chaque acide aminé. La valeur de ces affinités, mesurée par l'intensité des fluorescences observées au cours de l'action secondaire, varie considérablement d'un acide aminé à l'autre. En voici le classement par ordre d'affinités décroissantes :

- 1° le tryptophane ;
- 2° la tyrosine, la cystéine, la phénylalanine ;
- 3° la lysine, la sérine et, à un degré moindre, l'acide glutamique, la leucine et l'alanine ;
- 4° les acides inertes tels que le glycocolle, la méthionine, la proline.

Remarquons tout de suite que cet ordre correspond très exactement — la cystéine seule fait exception — à la facilité de fermeture de l'anneau : les acides des deux groupes de tête sont ceux pour lesquels cette fermeture est réalisable le plus facilement et, en même temps, avec une déformation minime ; dans le troisième groupe, au contraire, l'enroulement moléculaire entraîne une déformation profonde de la molécule.

II. LES TRANSFERTS DE CHARGE ÉLECTRIQUE CHEZ LES PROTÉIDES FORMOLÉS. — Le formol exerce sur les protéides une action secondaire analogue (variation du pouvoir rotatoire et apparition de fluorescence] (9). Les cyclisations et les déformations de l'action secondaire se traduisent alors par des modifications dans la valeur des charges électriques et dans leur répartition sur l'espace moléculaire.

Selon l'intensité du traitement formolé, une protéine va présenter deux aspects différents :

a) Tant que la concentration du formol reste inférieure à une certaine limite, les acides des deux premiers groupes, ceux dont l'affinité pour le formol est la plus marquée, sont seuls cyclisés. A ce moment la formolisation n'a encore entraîné aucune déformation structurale, ni déplacement de charges électriques, mais seulement une diminution de valeur pour certaines de ces charges. Par exemple, si la phénylalanine seule est intéressée par la cyclisation, un groupe aminé primaire — NH^2 — est remplacé par un groupe = NH noyé dans l'anneau hétérocyclique, d'où une diminution de la charge, ce qui pourra s'opposer à la fixation de cette protéine sur une autre, c'est-à-dire à la réaction de ces deux protéides. Cette interprétation traduit littéralement l'expérience de Pons (10) sur l'anatoxine tétanique : l'anatoxine tétanique se comporte comme une toxine qui a perdu son pouvoir fixateur sur le système nerveux, c'est-à-dire la possibilité de manifester sa toxicité.

(9) *C. R. Soc. Biol.*, séance du 27 juin 1942.

(10) PONS. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **429**, 209.

b) Pour une plus grande concentration du formol, les acides en chaîne droite subissent à leur tour l'enroulement moléculaire, d'où un bouleversement à la fois dans la valeur des charges électriques et dans leur répartition sur la molécule.

Il en résulte, pour les protéines, deux modes successifs de dénaturation par le formol : le premier, à peine marqué, n'est perceptible que par des réactions biologiques aussi sensibles que la fixation d'une toxine sur un tissu réceptif, ou par des moyens indirects comme l'examen des fluorescences en lumière de Wood ; le second entraîne au contraire une transformation structurale de la molécule.

III. CONSÉQUENCES IMMUNOLOGIQUES. — Dans le premier des modes de dénaturation que nous venons d'envisager, les structures superposables des deux antigènes (l'antigène naturel et l'antigène formolé) leur permettent de répondre l'un et l'autre au même anticorps : le pouvoir antigène spécifique est conservé. Dans le second mode, la protéine formolée n'est plus immunologiquement superposable à la protéine naturelle.

Par conséquent si l'on étudie, par rapport à la protéine initiale, les propriétés antigéniques d'une protéine traitée par des concentrations croissantes de formol, un point de scission se rencontre dans le comportement de l'anticorps produit par l'antigène formolé. Cet antigène fournit au début un anticorps aussi étroitement spécifique à lui-même qu'à l'antigène naturel. Mais, au delà d'un certain taux de formol, l'antigène formolé peut seul s'adapter à l'anticorps qu'il a engendré, alors que l'antigène naturel — non formolé — ne partage plus cette propriété, parce que de structure trop différente.

Pour fixer les idées, imaginons le cas d'un antigène dont le « motif » (11) serait constitué par du tryptophane, de la phénylalanine et de la lysine. Pour une très faible concentration de formol, l'action se borne à la cyclisation du seul tryptophane c'est-à-dire à une modification très discrète de l'antigène initial. Il en est encore de même quand, la concentration du formol augmentant, la phénylalanine est intéressée par la réaction. Mais si la lysine vient à subir à son tour l'enroulement moléculaire, l'action du formol aboutit à un nouveau protéide si différent du protéide initial que ces deux antigènes ne peuvent plus admettre un anticorps commun.

Cet exemple illustre la caractéristique essentielle de l'action du formol : sa possibilité, pour une concentration convenable, de détoxifier sans dénaturer. Plus exactement, il dénature toujours, mais à un degré qui peut être maintenu imperceptible à l'échelle

(11) P. GRABAR et D. DERVICHIAN. *Ces Annales*, 1942, 68.

immunologique : ainsi une anatoxine apparaît comme une toxine à la limite inférieure de la dénaturation.

IV. LA TRANSFORMATION DES TOXINES EN ANATOXINES (12). — Le mécanisme précédent — commun à toutes les protéines — explique la généralité des anatoxines pour toute toxine protéique, quelle qu'en soit l'origine. Mais, du fait même que cette fonction anatoxine est liée à une modification de la partie protéique de l'antigène, seuls les antigènes protéiques peuvent former des anatoxines. C'est pourquoi le formol ne réussit pas à détoxifier les antigènes glucido-lipidiques de A. Boivin, isolés à l'état pur (13).

A un autre point de vue, on peut distinguer deux catégories d'antigènes selon la nature de leurs acides aminés constitutifs et par conséquent selon la « qualité » de leurs anatoxines : les uns riches en acides des deux premiers groupes, cyclisables sans déformation, les autres, riches en acides à chaîne droite (ceux du 3^e groupe) et déformés par l'enroulement moléculaire. Il en résulte que les anatoxines du premier groupe engendrent des anticorps de spécificité plus marquée que celles du second groupe.

L'étude théorique permet ainsi de retrouver, pour les anatoxines, certaines des caractéristiques essentielles que G. Ramon a mises en évidence : le caractère irréversible de leur formation, la disparition rigoureuse de la toxicité et en même temps le maintien de la valeur antigène intrinsèque (14), ceci grâce à l'emploi d'une concentration convenable de formol. G. Ramon (15) a pu ainsi préparer une anatoxine de l'abrine, alors que Rehns avait échoué avec des doses excessives de formol. Un autre exemple est encore fourni par l'anatoxine dysentérique (16).

En résumé, le formol permet un mode de dénaturation tout à fait particulier, qui intéresse tous les constituants protéiques du milieu, mais sans aucune spécificité pour les toxines elles-mêmes. L'échelle de sensibilité des acides aminés au formol permet de prévoir certaines caractéristiques des anatoxines.

(12) Les milieux microbiens toxiques permettent l'observation des fluorescences caractéristiques de l'action secondaire du formol (J. Loiseleur et R. O. Prudhomme). *Ces Annales*, 1942, **68**, 480.

(13) A. BOIVIN, A. DELAUNAY et R. SARCIRON. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **134**, 1142.

(14) G. RAMON. *Ces Annales*, 1928, **52**, 959.

(15) G. RAMON. *Ces Annales*, 1925, **39**, 18.

(16) J. DUMAS, G. RAMON et Saïd BILAL. *Ces Annales*, 1926, **50**, 134.
« Pour obtenir l'anatoxine dysentérique, l'addition de 6 c. c. de formol à 1 litre de toxine est la dose optima. En effet, des doses moindres de formol (2, 3, ou 4 c. c.) sont insuffisantes, puisque, après un mois à l'étuve, la toxine ainsi formolée provoque encore la mort du lapin. Si l'on ajoute des doses supérieures de formol (7 ou 8 c. c. par litre), les propriétés antigéniques de l'anatoxine sont diminuées ».

SUR UN PHÉNOMÈNE DE LYSE LIÉ A L'INANITION CARBONÉE

par JACQUES MONOD *.

(Faculté des Sciences, Paris.)

Au cours de recherches récemment publiées dans leur ensemble (Monod, 1941), j'ai montré que, dans certaines conditions expérimentales, la croissance d'une culture bactérienne est limitée exclusivement par la concentration du milieu en source carbonée. On constate, dans ces conditions, que l'accroissement total des cultures est proportionnel à la concentration initiale de l'aliment carboné, et que la croissance ne s'arrête qu'une fois le milieu *totalement* épuisé.

Dans la plupart des cas la densité de la culture se stabilise alors à un niveau maximum qui peut demeurer constant pendant assez longtemps (plusieurs heures ou plusieurs jours). Mais avec certaines espèces bactériennes (*B. subtilis* en particulier), en présence de certains glucides, on assiste à une évolution toute différente : l'arrêt de la croissance est *immédiatement* suivi d'une lyse très rapide, qui peut aboutir en peu de temps à l'éclaircissement presque complet du milieu. C'est à ce phénomène, qui ne semble pas avoir été décrit jusqu'à présent, qu'est consacrée la présente note.

TECHNIQUES DE CULTURES ET DE MESURES.

J'en rappelle brièvement l'essentiel, ces techniques ayant été décrites plus amplement ailleurs (*loc. cit.*).

a) *Les cultures* sont faites dans des fioles coniques de 1 litre, constamment agitées au sein d'un thermostat à 37° et pourvues d'un dispositif permettant d'opérer des prélèvements aseptiques sans qu'il soit nécessaire de les retirer du thermostat.

Le milieu suivant a été utilisé :

NH ⁺ Cl	0,5	g.
SO ⁺ Mg	0,05	g.
SO ⁺ Fe	0,005	g.
Solution tampon	30	c. c.
Eau bidistillée	1.000	

La solution tampon (mélange PO⁺KH² et PO⁺K²H à 20 p. 100 environ) est ajustée à pH 6,95 ± 0,05. Dans ces conditions, le milieu est suffisamment tamponné pour que les variations de pH

(*) Communication présentée à la séance du 5 mars 1942 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

au cours de la croissance soient négligeables. Le glucide constituant l'unique aliment carboné est stérilisé à part et ajouté au moment de l'ensemencement.

b) *Les mesures* sont faites par opacimétrie, à l'aide de l'appareil de Meunier. On sait (Lwoff et Quérigo, 1938 ; Monod, *loc. cit.*) que les indications de cet appareil sont proportionnelles aux dilutions d'une même suspension bactérienne et expriment correctement l'accroissement des cultures. Dans les conditions de ces expériences, et avec la souche utilisée, une unité de densité optique équivaut à 0,8 mg. de substance sèche par litre environ.

La souche *B. subtilis* utilisée figure dans les collections de l'Institut Pasteur sous le nom de « Subtilis Caron ». Elle m'a été obligeamment communiquée par M. Legroux.

DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES.

Les deux courbes de la figure 1 montreront l'aspect du phénomène en question. Elles expriment la croissance de deux cultures de *B. subtilis* en milieu synthétique, en présence de glucose ou de saccharose comme aliment carboné. (Concentration initiale du glucide : 0,15 p. 1.000.) On voit que dans ces deux cas une lyse intense succède immédiatement à la croissance active. La « phase maximum » des courbes de croissance classiques est pratiquement remplacée par un point anguleux. Les cultures, dans ces deux cas, perdent 33 p. 100 de leur opacité en vingt minutes environ (1). L'examen de préparations colorées de cultures ayant achevé leur croissance une heure ou deux auparavant montre encore quelques bacilles ou amas de bacilles colorables, et de très nombreuses granulations, rares ou absentes dans les cultures en voie de croissance. Cette lyse ne paraît pas être accompagnée de sporulation, ce qui ne saurait surprendre, étant donné son extrême rapidité.

Ainsi que je l'ai rappelé plus haut, des recherches antérieures ont montré que, dans les conditions de ces expériences, la croissance ne s'achève qu'au moment précis où le milieu se trouve totalement épuisé en glucide. Il était donc tout naturel de supposer que la lyse elle-même était provoquée ou déclenchée par la disparition de l'aliment carboné. Cette hypothèse est aisément vérifiable : à une culture en train de se lyser activement, après avoir terminé sa croissance, on ajoute une petite quantité de glucose (0,1 p. 1.000 environ). On constate que l'addition du glucose est immédiatement suivie de l'arrêt de la lyse et de la reprise de la croissance (fig. 2).

(1) Il convient de noter ici que les données néphélométriques ne permettent pas de mesurer réellement un phénomène de lyse. Le louche apparu dans le milieu, du fait même de la lyse, constitue une cause d'erreur importante. Cette technique permet cependant d'évaluer approximativement l'intensité relative de la lyse dans différentes conditions.

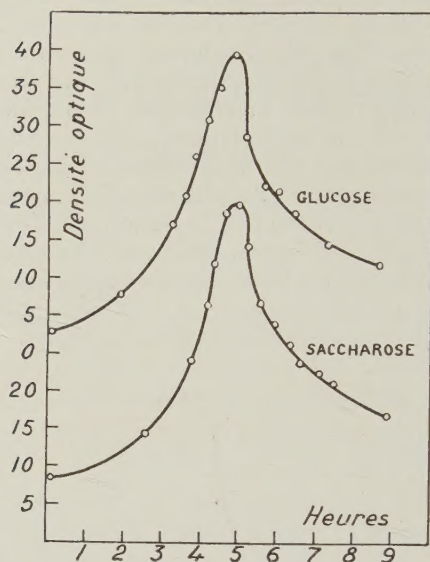


FIG. 1. — Croissance de deux cultures de *B. subtilis* en milieu synthétique, en présence de glucose ou de saccharose comme aliment carboné. La croissance active est immédiatement suivie d'une lyse très rapide.

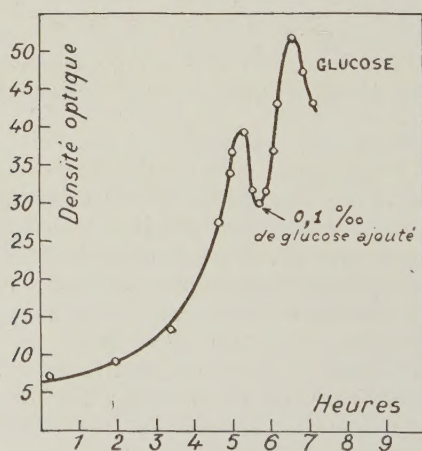


FIG. 2. — Croissance d'une culture de *B. subtilis* sur milieu synthétique glucosé. La lyse qui suit la croissance est immédiatement arrêtée lorsque du glucose est ajouté dans le milieu. La croissance reprend aussitôt.

Dans le cas qui nous occupe, la lyse est donc bien liée à l'absence d'une source carbonée utilisable. On doit se demander si l'absence d'une autre source alimentaire importante, par exemple de la source azotée, serait capable de provoquer le même phénomène. La figure 3 permettra de se rendre compte que l'évolution de la culture, après l'arrêt de la croissance, est alors toute différente. Cette figure exprime la croissance d'une culture de *B. subtilis* sur un milieu comprenant 0,025 p. 1.000 d' NH_4Cl , et 0,5 p. 1.000 de glucose. Dans ces conditions, la source azotée s'épuise avant la source carbonée et joue le rôle de facteur limitant. On voit que dans ce cas également l'arrêt de la croissance est suivi d'une cer-

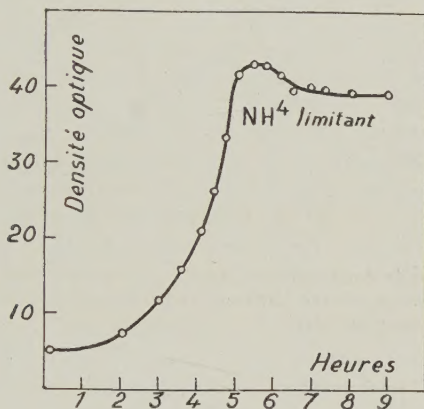


FIG. 3. — Croissance d'une culture de *B. subtilis* en milieu synthétique, l'aliment azoté (NH_4Cl) jouant le rôle de facteur limitant.

taine diminution d'opacité, mais celle-ci est beaucoup moins marquée que dans le cas précédent, et la densité optique se stabilise assez vite à un niveau beaucoup plus élevé. Le phénomène de lyse brutale et intense qui nous occupe ne se produit pas. Il semble donc bien que ce phénomène soit lié spécifiquement à l'absence d'une source carbonée.

Il y a plus : l'expérience montre que l'aspect des phénomènes est fort différent suivant la nature du glucide employé comme source carbonée. Nous avons vu qu'une lyse intense se produit après culture sur glucose ou sur saccharose. Avec le fructose, le mannose, la mannite, les résultats sont tout à fait comparables et les courbes obtenues semblables à celles de la figure 1. Elles sont au contraire tout à fait différentes lorsque la croissance se produit en présence de certains autres glucides tels que l'arabinose, la dextrine, la sorbite, l'inosite. La figure 4 donne un exemple du type de courbes obtenues : une fois la croissance

achevée, l'opacité ne baisse que lentement et graduellement, la culture sur sorbite ne perd 33 p. 100 de son opacité qu'au bout de trois heures et demie, la culture sur inosite au bout de cinq heures environ. Enfin les courbes obtenues avec le maltose paraissent correspondre à un cas intermédiaire. La lyse, assez marquée, est cependant beaucoup plus lente qu'avec les glucides tels que le glucose ou le saccharose. Les cultures perdent 33 p. 100 de leur opacité en une heure et demie environ. En somme, les sources

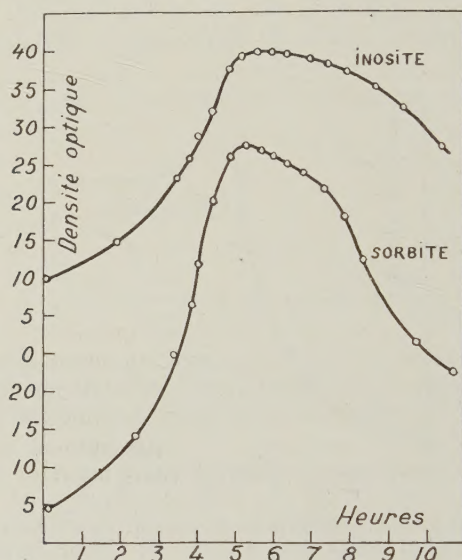


FIG. 4. — Croissance de deux cultures de *B. subtilis* en milieu synthétique, en présence de sorbite ou d'inosite comme aliment carboné. La lyse est beaucoup plus lente que dans le cas du glucose ou du saccharose (fig. 1).

ternaires essayées se classent nettement, le maltose à part, en deux catégories. Avec les uns la lyse est brutale et intense, avec les autres elle est beaucoup plus lente et d'aspect plus « normal ».

Il y a là un fait extrêmement curieux, d'où l'on pourrait espérer tirer des indications sur le mécanisme du phénomène. Divers types d'explication peuvent être envisagés, les plus vraisemblables paraissant être les suivants :

1° La lyse est un phénomène d'auto-oxydation se produisant en l'absence d'un substrat oxydable. Si elle ne se produit pas, ou peu, avec certains glucides, c'est que le métabolisme de ces glucides comporte la formation d'une substance carbonée de déchet éventuellement utilisable comme substrat oxydable « protecteur ».

2° La lyse est provoquée par une substance lytique apparais-

sant au cours du métabolisme de certains glucides, mais ne se formant pas, ou en quantités trop faibles, avec d'autres sources carbonées. Il faut supposer en outre que cette action lytique ne peut se manifester qu'en l'absence d'un substrat carboné utilisable.

3° Enfin, il est possible que la lyse plus ou moins rapide tienne seulement à des propriétés physiologiques acquises par les bactéries en présence de certains glucides et indépendantes de toutes substances apparues dans le milieu au cours de la croissance.

Les expériences suivantes ont été instituées afin de permettre un choix entre ces divers types d'explication. Les résultats s'étant en définitive avérés négatifs, je les résumerai brièvement.

a) Une culture ayant presque achevé sa croissance sur glucose est centrifugée et décantée. Une partie du culot est remise en suspension en milieu synthétique, sans source carbonée, une autre, servant de témoin, dans un milieu au glucose préalablement épuisé par la croissance d'une culture et centrifugé. Dans les deux cas on constate une lyse immédiate et intense. On doit en conclure que la lyse est bien déclenchée par la seule *absence* du substrat carboné, sans intervention d'une substance lytique apparue dans le milieu au cours de la croissance.

b) Une culture ayant presque achevé sa croissance sur glucose est centrifugée et décantée; une partie du culot est remise en suspension dans un milieu à l'inosite, préalablement épuisé en aliment carboné par la croissance d'une culture, et centrifugé, une autre en milieu synthétique neuf, sans aliment carboné. Ici encore la lyse est immédiate et intense dans les deux cas. Autrement dit, le milieu à l'inosite, épuisé, ne paraît contenir aucune substance capable d'exercer une action protectrice ou empêchante à l'égard de la lyse.

c) Ces expériences sont confirmées par les essais inverses: une culture, ayant achevé sa croissance sur inosite, est centrifugée et suspendue en milieu synthétique sans glucide. Une autre partie, servant de témoin, est remise en suspension dans son propre milieu. La lyse est légèrement plus rapide qu'après la croissance normale, mais encore très faible et sensiblement égale dans l'expérience et le témoin.

d) On peut montrer enfin que l'addition, dans une culture sur inosite ayant achevé sa croissance, de milieu (centrifugé) provenant d'une culture sur glucose en train de se lyser, est impuissante à provoquer ou à intensifier la lyse. Elle ne produit pas plus d'effet que l'addition d'eau distillée.

En résumé, ces diverses expériences donnent toutes des résultats négatifs, en ce sens que les divers changements de milieu paraissent impuissants à modifier la marche des phénomènes. En l'absence d'aliment carboné, les cultures ayant crû sur glucose se lysent toujours intensément, les cultures ayant crû sur inosite lentement et faiblement.

DISCUSSION.

Les hypothèses faisant intervenir l'action lytique ou protectrice d'une substance présente dans le milieu doivent donc être abandonnées, avec quelque regret peut-être, car celle d'une différence de propriétés physiologiques acquises au cours de la croissance offre beaucoup moins de prise à l'expérience.

On sait que la lyse des cellules bactériennes peut être provoquée dans des conditions très diverses (Nicolle, 1913). Ainsi Wollman (1932, 1936) a pu montrer que des agents réputés coagulants énergiques pouvaient dans certains cas déclencher la lyse bactérienne. Dans le cas qui nous occupe, le plus simple paraît être d'admettre qu'il s'agit d'un phénomène d'autolyse, c'est-à-dire d'autophagie enzymatique exceptionnellement intense. Ce qu'il s'agirait alors d'expliquer, c'est pourquoi l'intensité de ce phénomène peut dépendre dans certains cas de la nature du glucide utilisé comme source carbonée. Il paraît difficile de concevoir que ces faits puissent tenir à des différences de propriétés chimiques ou structurales de la matière vivante, envisagée comme substrat de ses propres enzymes, différences qui auraient dû, au moins dans certains cas, prendre naissance en présence de sources carbonées extrêmement voisines les unes des autres. En revanche, il se pourrait bien que les propriétés des enzymes responsables de l'autolyse soient modifiées en présence de substrats carbonés différents, même très voisins. Il semble bien en tous cas qu'une explication de ces phénomènes pourrait être recherchée dans cette voie et, à ce sujet, on doit mentionner un rapprochement assez frappant et peut-être significatif. Il sera nécessaire pour cela de rappeler tout d'abord certains résultats de recherches antérieures.

L'étude de la croissance des cultures bactériennes dans des mélanges de glucides (Monod, *loc. cit.*) montre qu'en présence de certains mélanges la croissance se décompose en deux poussées distinctes, correspondant chacune à l'utilisation exclusive de l'un des deux constituants carbonés du milieu. L'analyse de ce phénomène (que j'ai désigné sous le nom de « diauxie ») conduit à admettre que certains substrats carbonés exercent une action inhibitrice à l'égard des enzymes correspondant à des corps voisins. Il semble, en outre, que les enzymes inhibés appartiennent à la catégorie des enzymes « adaptatifs » et que les enzymes non inhibés soient des enzymes « constitutifs » au sens de Karström (1930). Les glucides utilisables par une souche bactérienne se classent ainsi en deux catégories suivant qu'ils correspondent ou non à des enzymes susceptibles d'être inhibés en présence de certains substrats. Or il se trouve que, pour la souche de *B. subtilis* utilisée, ces deux catégories comprennent les corps suivants :

a) Substrats ternaires correspondant à des enzymes non susceptibles d'inhibition : *saccharose, glucose, fructose, mannose, mannite.*

b) Substrats ternaires correspondant à des enzymes susceptibles d'inhibition : *arabinose, sorbite, inosite, maltose, dextrine*.

On peut constater que la liste a) comprend tous les glucides provoquant une lyse rapide et intense, la liste b) les corps qui ne donnent pas lieu à ce phénomène. Il convient cependant de faire une restriction pour le maltose, avec lequel, comme nous l'avons vu, on obtient des résultats intermédiaires. Quoi qu'il en soit, il y a là une remarquable coïncidence qui mérite d'être soulignée. Il serait bien difficile d'ailleurs d'en proposer à l'heure actuelle une explication. Le mécanisme des processus d'adaptation et d'inhibition enzymatique, qui sont à la base du phénomène de diauxie, est loin d'être clair. Il ne paraît guère douteux cependant que ce rapprochement soit significatif. Il est permis d'en conclure que les phénomènes de lyse qui viennent d'être décrits relèvent bien d'un mécanisme enzymatique et que les différences constatées entre l'action de glucides différents doivent avoir pour base des modifications ou des adaptations de propriétés enzymatiques acquises en présence de ces substrats. On peut espérer que les progrès qui pourront être réalisés dans l'analyse de l'une de ces catégories de phénomènes éclaireront l'interprétation de l'autre.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° L' inanition carbonée provoque chez *B. subtilis* une lyse rapide et intense.

2° Cette lyse brutale ne se produit cependant que lorsque la croissance a eu lieu aux dépens de certains corps ternaires (saccharose, glucose, fructose, mannose, mannite). Avec d'autres (arabinose, dextrine, sorbite, inosite) elle est beaucoup plus lente et progressive.

3° Il est possible que ces différences soient dues à des variations de propriétés des enzymes responsables de l'autolyse ; variations qui seraient provoquées par l'utilisation de certains substrats.

TRAVAUX CITÉS

KARSTRÖM (H.). Ueber die Enzyymbildung in Bakterien, und über einige physiologische Eigenschaften der untersuchten Bakterienarten. *Thèse*, Helsingfors, 1930.

KARSTRÖM (H.). *Erg. der Enzymforsch.*, 1938, **7**, 350.

LWOFF (A.) et QUÉRIDO. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1039.

MONOD (J.). *C. R. Ac. Sci.*, 1941, **212**, 771.

MONOD (J.). *C. R. Ac. Sci.*, 1941, **212**, 934.

MONOD (J.). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. *Act. Scient. et Ind.* Hermann, Paris.

NICOLLE (M.). *Ces Annales*, 1913, **27**, 97.

WOLLMAN (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 578.

WOLLMAN (E.). et M^{me}. *Ces Annales*, 1936, **56**, 137.

LES MODIFICATIONS ANATOMO-PATHOLOGIQUES PROVOQUÉES PAR LE BCG AU NIVEAU DES SCARIFICATIONS CUTANÉES

par J. BRETEY.

(Institut Pasteur, Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)

La méthode des scarifications est très favorable à l'étude des processus cellulaires qui suivent l'introduction du BCG dans les tissus de l'organisme. Il est, en effet, facile d'échelonner chez un même cobaye des prélèvements de peau. Il suffit d'examiner des coupes orientées perpendiculairement au trait de scarification pour se faire une représentation exacte de l'évolution des lésions locales et du sort des germes introduits.

Les coupes faites quelques minutes après la scarification montrent la plaie qui intéresse l'épiderme ainsi que la couche papillaire du derme. Sur ses parois on trouve des éléments assez nombreux de BCG, isolés ou agglutinés en petits amas. Elle est en partie envahie par un exsudat lymphatique, riche en fibrine, mêlé à un peu de sang si la scarification a lésé de petits vaisseaux. Il n'y a encore aucune réaction cellulaire.

A la cinquième heure, on constate que sur une légère épaisseur, les bords de la plaie sont plus intensément colorés par la fuchsine. En effet, à ce niveau les tissus ont été meurtris par le traumatisme et ces régions, frappées de nécrose, seront éliminées par la suite. Mais déjà la réaction cellulaire est très nette : entre les faisceaux conjonctifs on voit des coulées de polynucléaires provenant des vaisseaux lymphatiques et sanguins. Ils convergent tous vers la plaie de scarification. Celle-ci est comblée par un coagulum fibrineux qui retient une fraction des bacilles, mais un certain nombre de ces derniers sont au contact des tissus sains où ils ont été entraînés par les polynucléaires qui les ont phagocytés. On en retrouve à 50 μ des bords de la plaie.

Vingt-quatre heures après la scarification, la coupe présente le même aspect, mais plus accusé encore. Les polynucléaires, tassés les uns contre les autres entre les travées du tissu conjonctif, forment une véritable barrière colorée par le bleu de méthylène. Plus en dehors se trouvent le coagulum fibrineux et les fragments de tissu trop lésés pour être conservés, et dont l'ensemble, coloré

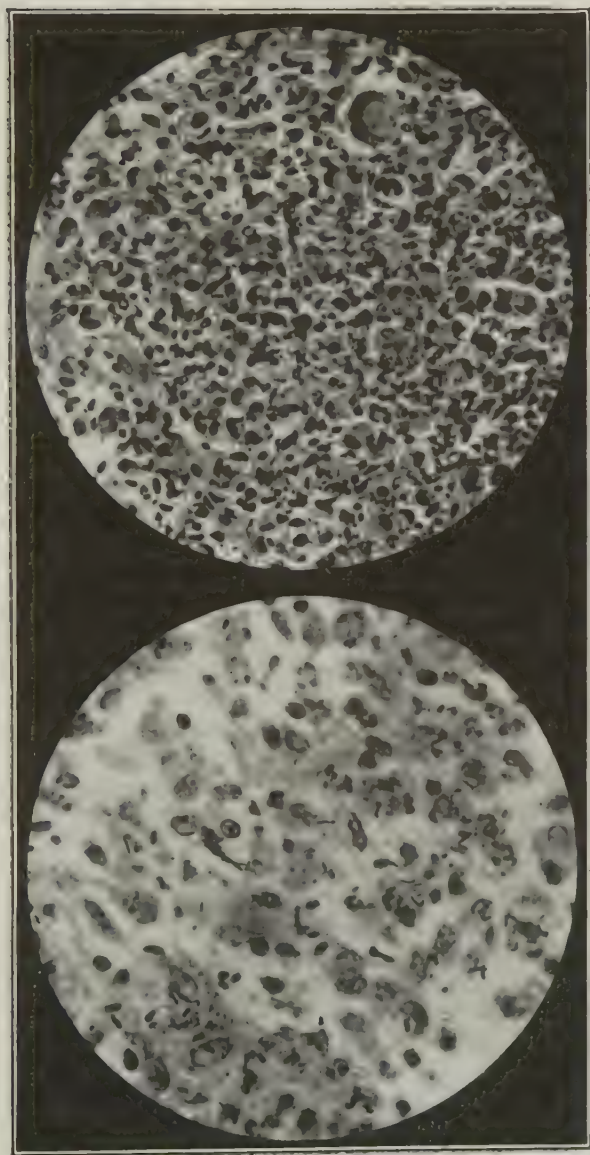


FIG. 1 et 2.

par le Ziehl, forme la croûte qui va tomber rapidement. En profondeur, les bacilles sont plus nombreux et on les retrouve plus loin, entraînés par les éléments cellulaires. La congestion vasculaire est nette, mais il n'y a pas encore de réaction à caractère spécifique.

Dans les jours qui suivent, la croûte tombe et souvent la brèche épidermique est déjà réparée. Nous n'avons jamais, à aucun moment, trouvé de bacilles acido-résistants ni de lésions au niveau de l'épiderme. Dans l'épaisseur du derme, à partir du troisième jour, on constate la disparition de la plus grande partie des polynucléaires. Ils sont ensuite remplacés par des monocytes assez nombreux, contenant des éléments microbiens, soit isolés, soit plus souvent en petits amas dont l'aspect donne l'impression que dès ce stade ils se sont multipliés dans une certaine mesure. Au voisinage même de la scarification, on peut voir des capillaires de néoformation.

Au cours de la seconde semaine la lésion augmente d'importance, grâce à l'entrée en scène de nouveaux monocytes, et surtout de très nombreuses cellules épithélioïdes. Certaines de celles-ci donnent par fusion de petites cellules géantes à 3, 4, 5 noyaux. D'assez nombreux lymphocytes sont éparpillés un peu partout. La congestion est assez intense. Les éléments bacillaires sont intracellulaires, souvent en amas. Si l'on parcourt l'ensemble de la lésion, on constate qu'ils sont beaucoup plus nombreux que ceux déposés par le vaccinostyle au moment de la scarification. Leur culture sur place est manifeste surtout vers le vingtième jour (fig. 1 et 2).

Le nombre des bacilles va ensuite en diminuant, sans qu'il soit possible de dire par quel mécanisme exact, car on ne trouve pas de formes altérées suggérant l'idée d'une destruction sur place par lyse ou digestion cellulaire. Malgré cette diminution du nombre des éléments acido-résistants, la lésion continue à augmenter jusque vers la sixième semaine. Elle est alors formée d'une grande majorité de cellules épithélioïdes, avec des cellules géantes typiques, mais moins nombreuses et moins grandes que celles que l'on rencontre habituellement dans les lésions à bacilles tuberculeux virulents (fig. 3).

Dans certains cas le centre de la lésion peut tendre vers l'abcès, mais la plupart du temps il n'y a pas à proprement parler de collection purulente. Dans cette zone, si elle existe, les bacilles restent plus longtemps nombreux, alors qu'ils deviennent très rares là où il n'y a que des cellules épithélioïdes.

A partir de ce moment la lésion va en s'atténuant progressivement (fig. 4). Finalement, sous l'épiderme absolument intact, on ne retrouve que quelques fibroblastes.

Tel est le déroulement des faits chez la majorité des animaux ;

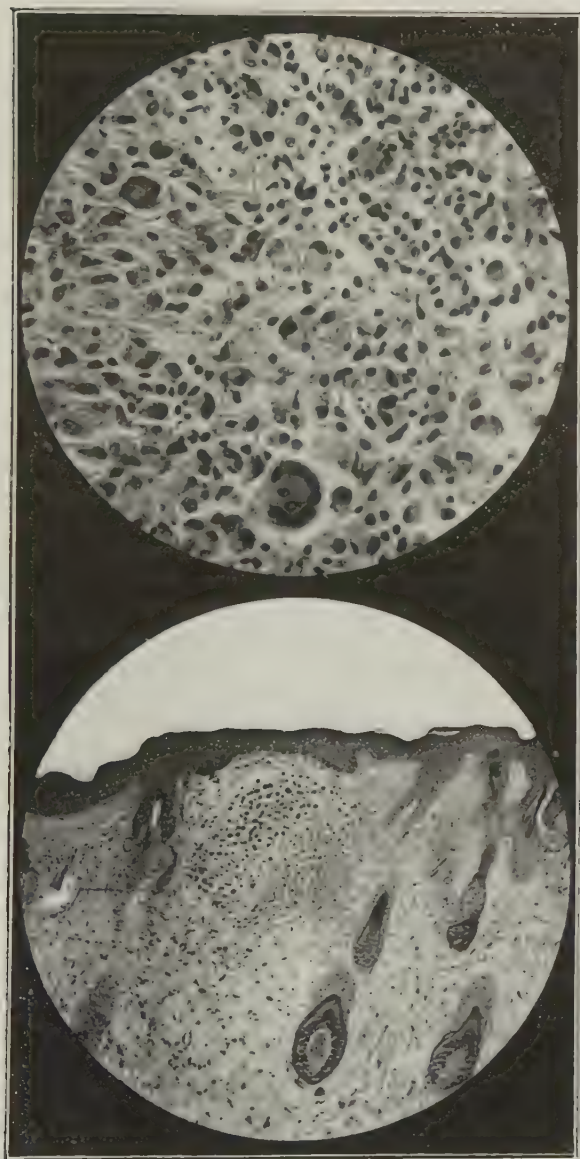


FIG. 3 et 4.

cependant chez certains on assiste à une évolution accélérée, s'accompagnant de réactions moindres. La multiplication des bacilles est plus discrète et la lésion, beaucoup moins riche en cellules épithélioïdes, évolue vers la guérison histologique complète en trois à quatre semaines. On peut se demander si ce n'est pas chez eux l'expression d'une résistance plus forte du terrain à l'égard d'une infection à bacilles acido-résistants.

Dans d'autres communications faites avec L. Nègre, nous avons montré que chez les animaux sacrifiés avec du BCG il est possible de mettre en évidence, de façon très précoce, l'allergie et l'immunité : dès le quatrième jour pour la première et dès le neuvième pour la seconde. Aussi est-il intéressant de rapprocher ces constatations du type des modifications qui existent au même moment au niveau du point de pénétration du vaccin. On est alors frappé par le caractère encore peu spécifique des lésions, par leur étendue relativement faible et par le nombre des éléments acido-résistants qui n'a pas atteint le maximum que l'on observe par la suite.

Si on compare notre description à celle donnée par R. Laporte (*C. R. Soc. Biol.*, **115**, 3 mars 1934, p. 931), qui a observé l'évolution histologique des lésions au niveau du derme à la suite de l'injection dans ce dernier de bacilles tuberculeux virulents, on trouve un nouvel exemple du caractère absolument bénin des lésions dues au BCG. Celles-ci, bien que comprenant des éléments cellulaires identiques à ceux des tubercules, guérissent néanmoins rapidement et totalement.

RECHERCHES SUR LA TENEUR EN BORE DES GRAINES

par GABRIEL BERTRAND (1).

Actuellement, de très nombreuses déterminations quantitatives de bore, plusieurs centaines, ont été effectuées soit chez des plantes entières, soit chez des organes séparés, à l'exclusion, toutefois, à peu près totale des graines. Les résultats que nous apportons aujourd'hui ont pour objet de combler cette lacune.

Dans l'intention de servir autant que possible l'intérêt théorique et l'intérêt pratique, nous avons choisi la plus grande partie des graines que nous avons examinées parmi celles qui servent de semences en agriculture, qui sont employées comme matières premières dans l'industrie ou qui sont utilisées pour la nourriture de l'homme et des animaux. Nous n'avons pas oublié, néanmoins, de nous adresser à des représentants très variés de la classification botanique. Parmi les céréales, le froment, le seigle, le maïs, l'orge, le sarrazin et l'avoine ont été pris sous les formes que l'on rencontre d'ordinaire dans le commerce ; le riz, au contraire, a été retiré par nous des grains de paddy et nous avons analysé l'amande entière à l'exclusion de la dure enveloppe qui constitue la balle. Le café, le cacao et le poivre noir provenaient tels quels du commerce, tandis que nous avons séparé les graines ou noyaux de dattes de la chair sucrée qui les enveloppait. Les autres graines, depuis le radis, le pois et le lin jusqu'au chanvre, au ricin et au marron d'Inde, ont été analysées de telle manière que les chiffres que nous donnons se rapportent à la graine entière, c'est-à-dire à l'ensemble amande et tégument.

Faisons remarquer, enfin, que dans le cas des Ombellifères, où il est très difficile de séparer la graine du péricarpe et du calice qui les protègent, ce que nous avons étudié sous le nom communément employé de « graine » n'est autre chose que le fruit.

Pour l'analyse, les graines, ou soi-disant telles, ont été d'abord bien nettoyées, parfois lavées et séchées, puis triées une à une et passées au moulin. Lorsque le tégument et l'amande étaient de consistances trop différentes, comme dans le cas du marron d'Inde, on a analysé séparément les deux parties et l'on a tenu compte, dans le calcul, de leurs proportions respectives comme de leurs teneurs propres en bore.

La méthode de dosage a été, comme dans nos recherches anté-

(1) Un extrait de ce *Mémoire* a paru dans les *C. R. Acad. Sci.*, 1941, **213**, n° 6, p. 221.

rieures, la méthode microcolorimétrique, ce qui a permis d'opérer sur des prises d'essai de l'ordre du gramme (entre 0 gr. 8 et 1 gr. 1 dans la presque totalité des cas).

Les résultats actuels de cette étude sont présentés dans le tableau par ordre croissant de la teneur en borse, rapportée à la matière sèche. Les majuscules G, O, P et C, apposées aux noms des graines, indiquent que celles-ci appartiennent aux familles des Graminées, des Ombellifères, des Papilionacées et des Crucifères.

NOMS DES GRAINES	CENDRES p. 100 de matière sèche	BORE en milligrammes par kilogramme de matière sèche
Avoine G.	3,40	7,1
Cacao	3,02	7,8
Café du Brésil	4,38	7,8
Seigle (géant d'hiver) G.	2,04	8,9
Maïs G.	1,94	9,4
Riz G.	1,60	9,4
Fève Tonka	3,20	9,6
Persil O	7,70	9,8
Luzerne P.	3,75	9,9
Dattier.	1,16	10,2
Eséré P	3,86	10,3
Froment G.	2,29	10,4
Tabac des paysans.	4,40	10,4
Marronnier d'Inde	2,86	10,6
Fève P.	3,35	10,7
Lin	4,88	10,7
Lunaire C.	3,32	10,9
Soja. P	3,78	11,1
Cerfeuil D	13,93	11,1
Colza C.	4,89	11,4
Sarrazin	2,00	11,4
Lis blanc.	3,25	12,0
Fenu grec P	6,50	12,1
Moutarde blanche C	5,61	12,2
Chanvre	5,20	12,5
Orge G.	3,14	13,3
Lentille P.	2,80	13,4
Pois P	3,30	13,6
Pavot.	2,72	13,6
Céleri O	9,45	13,7
Trèfle incarnat P.	3,85	13,7
Pois chiche P.	3,03	14,0
Radis C	4,38	14,3
Moutarde noire C	4,00	15,0
Coriandre O.	5,95	15,2
Ricin.	3,34	15,4
Haricot P	4,33	16,7
Poivre	4,26	18,6
<i>Iberis umbellata</i> C.	5,38	18,7
Petite ciguë O.	7,20	18,8
Anis O.	10,00	19,9
Ciguë vireuse O.	7,18	20,6

Un examen quelque peu attentif de ces résultats permet de faire plusieurs remarques intéressantes.

En premier lieu, le bore existe dans toutes les graines examinées, ce qui étend à ces importants organes de conservation et de multiplication une règle qui n'avait encore été démontrée expérimentalement que pour les appareils végétatifs.

On rencontre le bore dans les graines à des teneurs comprises entre 2 milligr. 1 et 20 milligr. 6 par kilogramme de matière sèche, c'est-à-dire à des doses ne différant pas les unes des autres de plus de 1 à 3.

Chez les plantes qui les produisent, les quantités de bore sont beaucoup plus variables, elles ont été trouvées jusqu'ici entre 2 milligr. 3 et 95 milligrammes par kilogramme de matière sèche, s'élevant ainsi dans un rapport qui va de 1 à 40.

La compression dans les teneurs en bore quand on passe des plantes aux graines tend à masquer la règle de répartition du métalloïde entre les groupes végétaux sur laquelle nous sommes revenu il y a peu de temps (2), mais il ne la masque pas en entier : les graines de Graminées sont toujours parmi les plus pauvres, celles de Papilionacées et de Crucifères se tiennent le plus souvent encore en bonne place.

Une nouveauté semble apparaître : les chiffres trouvés pour la petite ciguë, l'anis et la ciguë vireuse, qui appartiennent à la famille des Ombellifères, sont les plus élevés de la liste. Nous nous sommes demandé, avant de conclure à une teneur si haute en bore des graines d'Ombellifères, si les chiffres donnés dans le tableau ne provenaient pas de ce que, dans les soi-disant « graines » d'Ombellifères, les restes de péricarpe et de calice contiendraient beaucoup plus de métalloïde que les graines proprement dites qui y sont incluses.

Pour répondre dans une certaine mesure à cette question, nous nous sommes adressé aux fruits de Coriandre, chez lesquels il est, exceptionnellement, assez facile de libérer les amandes en s'aidant d'un scalpel ou d'un canif. Nous avons traité 100 de ces fruits, pesant ensemble 1 gr. 58 et, après dessiccation à 100° : 1 gr. 48 ; nous en avons séparé 0 gr. 87 de graines et 0 gr. 61 de restes de péricarpe et de calice. L'analyse nous a donné alors :

	GRAINES	RESTES
Prises d'essai, en gramme	0,87	0,61
Cendres, pour 100 de matière sèche. . . .	5,75	6,23
Bore trouvé, en milligramme.	0,0125	0,010
Bore, par kilogramme en milligrammes. .	14,4	16,4

résultats d'après lesquels les amandes du Coriandre et probable-

(2) Ces *Annales*, 1941, 67, n° 2, p. 154.

ment des Ombellifères ne présenteraient pas une teneur aussi exceptionnelle qu'il apparaissent d'abord, mais se rangeraient cependant parmi les plus riches, en bonne place à côté des graines de Papilionacées et de Crucifères.

Une conséquence d'intérêt physiologique particulier découle de l'inégale concentration du métalloïde dans les graines et dans les plantes qui les produisent. Chez les espèces qui sont relativement riches en bore, les graines renferment des proportions du métalloïde notablement plus petites que les plantes. C'est l'inverse qui a lieu chez les espèces les plus pauvres. Tout se passe comme s'il existait chez ces dernières un mécanisme compensateur assurant à la graine un approvisionnement en bore peu éloigné de celui qui existe dans les graines des espèces les mieux pourvues.

Ainsi le passage des substances minérales du corps de la plante dans les graines ne serait probablement pas aussi simple qu'on avait été tenté jusqu'ici de l'imaginer. De nouvelles observations devront être faites pour en éclairer le véritable processus.

ACTION PHYSIOLOGIQUE ET THÉRAPEUTIQUE DES COMPOSÉS DU GERMANIUM SUR LES ANIMAUX ET LES PLANTES

par ARAKEL TCHAKIRIAN.

PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES. — Le germanium existe normalement dans l'organisme humain ; il forme un des constituants normaux du plasma sanguin [1].

Les premiers travaux sur les effets physiologiques des composés du germanium sont de date récente.

Il a été démontré que le dioxyde de germanium (GeO_2), en solution aqueuse, injecté aux rats albinos à la dose de 180 mg. par kilogramme de poids de corps, ne produit aucune eschare et n'est pas toxique [2]. Au point de vue de la toxicité, il ressemble aux terres rares [3]. Par contre, les sels germaneux (GeO) sont très toxiques et sont des réducteurs énergiques (recherches inédites de A. Tchakirian). Certains auteurs ont attribué à l'oxyde de germanium un pouvoir érythropoïétique très net et ont préconisé son emploi contre l'anémie pernicieuse. Le rein l'élimine rapidement [4 et 5]). Mais l'augmentation des globules rouges a été réfutée par Bodansky [6].

Chez les lapins, le dioxyde de germanium, employé sous forme de tartrate double de sodium et de germanium, injecté à la dose de 15 mg de GeO_2 par kilogramme de poids de corps, produit une augmentation temporaire des érythrocytes. Une application parentérale de 30 mg. de GeO_2 porte pendant plusieurs jours à 1,9 millions le nombre des érythrocytes et à 35 p. 100 le contenu de l'hémoglobine dans le sang [7].

De même, V. Myers et H. Beard ont montré que le germanium, comme le cuivre et le manganèse, favorisent considérablement l'action des composés ferriques en sensibilisant, pour ainsi dire, le système hématopoïétique à l'action de ce dernier. C'est ainsi que chez le rat nourri au lait, à qui l'on donne journallement 0,5 mg. de fer, l'addition des produits ci-dessus indiqués, provoque une poussée érythrocytique particulièrement marquée et une atténuation considérable des symptômes anémiques [8].

Le dioxyde de germanium, administré à fortes doses, peut modifier si fortement l'état général de l'organisme, qu'il en résulte une perte de poids.

L'hydrure de germanium (GeH_4) est bien moins toxique que l'hydrure d'étain (SnH_4) qui est un poison très violent pour les souris et les cobayes et non pour les grenouilles. La toxicité de l'hydrure de germanium semble dépendre, comme dans le cas de l'hydrure d'étain, de l'action sur le système nerveux central. Le sang n'est pas altéré [9].

ACTION DU GERMANIUM SUR LES CARCINOMES. — L'action des composés du germanium sur les carcinomes a été étudiée par quelques auteurs, notamment par Fusao-Ischiwara au cours de ses essais sur 25 éléments. Il distingue quatre groupes, suivant l'effet des éléments sur la croissance des tumeurs cancéreuses. Dans le quatrième groupe, il classe les six éléments suivants : Césium, Cérium, Germanium, Sélénium, Scandium et Ytterbium, dont l'action inhibitrice sur la croissance du cancer est certaine. Le Germanium a été essayé ici sous forme de dioxyde [10].

Ces résultats ont été contestés par Burton, T. Simpson et Mil-lard C. Marsh [11].

L'action de différents composés organiques du germanium sur la croissance des carcinomes a été étudiée d'une façon systématique par MM. Rothermandt et Burschkies [12].

Le tableau ci-dessous donne la liste des composés expérimentés, leur composition chimique et la dose nuisible pour les souris blanches, en milligrammes par 20 gr. d'animal.

Dioxyde de germanium GeO_2	25
Disulfure de germanium GeS_2	12,5
Tétraéthyle de germanium $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{Ge}$	50
Tétra-iso-amylgermanium $(\text{C}_5\text{H}_{11})_4\text{Ge}$	50
Chlorure de tri-cyclohexyl germanium $(\text{C}_6\text{H}_{11})_3\text{GeCl}$	25
Bromure de tri-cyclohexyl germanium $(\text{C}_6\text{H}_{11})_3\text{GeBr}$	50
Iodure de tri-cyclohexyl germanium $(\text{C}_6\text{H}_{11})_3\text{GeI}$	50
Hydroxyde de tri-cyclohexyl germanium $(\text{C}_6\text{H}_{11})_3\text{GeOH}$	50
Tétraphényl germanium $(\text{C}_6\text{H}_5)_4\text{Ge}$	50
Tétrabenzyl germanium $(\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2)_4\text{Ge}$	25
Tétraparatolyl germanium $(\text{CH}_3 - \text{C}_6\text{H}_4)_4\text{Ge}$	50
Hexaphényl digermanium $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{Ge} - \text{Ge}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$	50
Oxyde de triphényl germanium $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{Ge} - \text{O} - \text{Ge}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$	50
Bromure de tribenzyl germanium $(\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2)_3\text{GeBr}$	100
Iodure de tribenzyl germanium $(\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2)_3\text{GeI}$	50
Anhydride de l'acide bis-phénylgermanique $(\text{C}_6\text{H}_5\text{GeO})_2\text{O}$	12,5
Anhydride de l'acide bis- <i>p</i> -tolylgermanique $(\text{CH}_3 - \text{C}_6\text{H}_4\text{GeO})_2\text{O}$	25
Anhydride de l'acide bis- <i>p</i> -diméthyl-amino-phénylgermanique $[(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{GeO}]_2\text{O}$	25
Anhydride de l'acide bis- <i>p</i> -diéthyl-amino-phénylgermanique $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{GeO}]_2\text{O}$	50
Anhydride de l'acide bis-nitro-diméthyl-amino-phénylgermanique $[(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2\text{GeO}]_2\text{O}$	50
Sesquisulfure de diphenyl germanium $(\text{C}_6\text{H}_5\text{GeS})_2\text{S}$	25
Sesquisulfure bis-4-diméthyl-amino-phényl germanium $[(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{GeS}]_2\text{S}$	50
Sulfure de tribenzyl de germanium $(\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2)_3\text{Ge} - \text{S} - \text{Ge}(\text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_5)_3$	»

D'après les auteurs, les résultats obtenus avec les composés aliphatiques et aromatiques du germanium sont peu intéressants au point de vue de la thérapeutique du cancer. Par contre, ils ont observé que dans les essais prophylactiques, la vitesse de croissance des tumeurs était bien abaissée par rapport à celle des essais de contrôle correspondants.

Ces mêmes auteurs ont montré que la toxicité des combinaisons de germanium est très faible par comparaison à celle des composés de l'étain et dépend de la structure de la molécule. Il s'avère ainsi que le bisulfure de germanium comme l'anhydride de l'acide diphenyl germanique sont plus toxiques que les combinaisons halogénées du benzyl-germanium. Les dérivés alcoylés et phénylés du germanium, tels le germanium tétraméthyle et le germanium tétraéthyle ne sont pas toxiques. Tandis que les dérivés correspondants de l'étain sont, au contraire, de violents poisons du système nerveux.

Les mêmes auteurs ont aussi expérimenté l'effet thérapeutique des combinaisons indiquées dans le tableau, sur des souris qui avaient été, la veille, inoculées avec des trypanosomes (*Nagana*), des spirochètes, des pneumocoques et finalement des streptocoques. On n'a pas obtenu d'effet thérapeutique, ou même de changement dans l'évolution de la maladie, qu'on administre la dose tolérée ou la dose toxique.

D'autres auteurs ont montré que le pouvoir trypanocide du sang humain séché, est renforcé en présence de germanium [13].

J. Bardet, F. Billon et A. Tchakirian ont étudié l'action du dioxyde de germanium en solution aqueuse, soit seul, soit en présence de mannite, sur les tumeurs épithéliales et sarcomateuses expérimentales des souris et des singes (Recherches inédites, 1929-1932).

La solution mannitique utilisée était obtenue en dissolvant 10 g. de dioxyde de germanium en présence de 20 g. de mannite, par ébullition dans un litre d'eau distillée. Dans ces conditions, se forme l'acide mannitodigermanique de formule $[\text{Ge}_2\text{O}_5(\text{m})\text{n}]\text{H}_2$, qui présente manifestement les caractères d'un complexe parfait. La solution de l'acide mannito-digermanique possède un $\text{pH} = 4,0$, alors que le pH de la solution aqueuse de l'oxyde GeO_2 est environ 6,8 (6 g. GeO_2 p. 1.000) [14].

Bien qu'il ait été possible d'obtenir quelques résultats satisfaisants, ces recherches ont dû être prématurément interrompues, par suite du manque de ressources. L'inconstance de données expérimentales insuffisantes ne nous a pas permis de conclure à une action efficace du germanium sur les carcinomes.

On n'a que peu de données sur le traitement du cancer humain par le germanium. Dans le but d'apporter une contribution à cette étude, J. Magrou et A. Tchakirian ont essayé, à la Salpê-

trière, dans le Service de M. le Professeur A. Gosset, l'action du germanium sur le cancer.

Deux malades atteints d'épithéliomas inopérables ont été traités par injections intraveineuses d'oxyde de germanium à l'état de tartrate soluble. Le premier malade, présentant un volumineux épithélioma de la région du larynx et du plancher de la bouche, s'accompagnant de gêne intense de déglutition et de cornage, a présenté, au bout de douze jours, une amélioration passagère, se traduisant par la disparition du cornage et de la gêne de déglutition, avec reprise de l'appétit. Puis son état s'est à nouveau progressivement aggravé et le malade a succombé deux mois après le début du traitement.

Dans le second cas, il s'agissait d'un épithélioma inopérable du rectum, traité par un anus artificiel. Un examen rectoscopique pratiqué un mois après le début du traitement par le germanium, n'a montré, par rapport à l'examen fait avant ce traitement, ni diminution ni augmentation de la masse. Mais les bourgeons étaient plus lisses, moins friables et moins saignants. Le malade a augmenté de poids, passant de 66 kilogr. 9 à 72 kilogr. 25 en trois mois. Par la suite, les rectoscopies successives ont montré une augmentation progressive de la tumeur, et le malade a succombé un mois après le début du traitement. Il est à noter que les deux malades ont succombé sans douleur.

On a aussi essayé sur deux autres malades, l'action du tétrathioorthogermanate de phényl [15] $(\text{SC}_6\text{H}_5)_4\text{Ge}$, en solution huileuse, administré par injections intra-musculaires comme dans les cas précédents ; les tumeurs ont diminué de volume, mais les malades ont succombé sans douleur après quelque temps (recherches inédites 1932-1941).

En résumé, dans ces 4 cas, qui étaient d'ailleurs désespérés, le traitement par le germanium n'a été suivi que d'une amélioration fugace. Ces résultats encouragent toutefois à poursuivre les essais, en cherchant à administrer le germanium sous une forme plus efficace, comme dans le cas de la chimiothérapie arsenicale de la syphilis par exemple, par de l'atoxyl ou le salvarsan.

L'ACTION PHYSIOLOGIQUE ET THÉRAPEUTIQUE DU GERMANIUM SUR LES PLANTES. — L'action du germanium a été aussi étudiée sur les plantes. On offre à différentes plantes jusqu'à 10 mg. de germanium par kilogramme de terre. Dans ces conditions, elles absorbent et fixent jusqu'à 75 p. 100 de la quantité contenue dans le milieu. De faibles concentrations ont toujours un effet toxique, qui se traduit par une croissance ralentie et un jaunissement des feuilles.

Aspergillus niger emmagasine de fortes quantités de germanium, sans que la croissance en souffre. Les cendres peuvent contenir jusqu'à 3,7 p. 100 de germanium [16].

A. Gosset, J. Magrou et A. Tchakirian ont étudié l'action de divers éléments sur les tumeurs produites chez le *Pelargonium zonale* par l'inoculation du *Bacterium tumefaciens*.

Ils ont observé que, seul, parmi les éléments essayés, le germanium, introduit dans la circulation générale de la plante, a manifesté une action élective sur les tumeurs, dont il a provoqué la nécrose en quelques jours, nécrose d'ailleurs incomplète, puisque des récidives se produisent aux dépens d'îlots méristématiques restés vivants. Aux concentrations de 0,18 et de 0,9 p. 1.000, le germanium n'empêche pas la culture du *Bacterium tumefaciens*, mais la ralentit légèrement [17].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Christian ZBINDEN, thèse Lausanne, 1930.
- [2] F. S. HAMMETT, J. H. MULLER et J. E. MOWREY. *J. exp. Ther.*, 1922, **91**, 357.
- [3] G. H. BAILLY, P. B. DAVIDSON et J. H. BUNTING. *J. Am. med. Assoc.*, 1925, **84**, 1722.
- [4] J. H. MULLER et IZSARD. *J. metabolic Research.*, 1923, **3**, 181 et *Am. J. med. Sciences*, 1922, **142**.
- [5] J. H. MULLER. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 1931, **42**, 277.
- [6] BODANSKY. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1923, **20**, 534.
- [7] I. KEESER. *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1926, **113**, 232.
- [8] V. MYERS et H. BEARD. *J. Am. med. Assoc.*, 19 octobre 1929, **43**.
- [9] F. PANETH et JOACHIMOGLU. *Ber.*, 1924, **27**, 1925.
- [10] FUSAO-ISHIWARA. *J. Cancer Research*, 1927, **21**, 1 et *Ber. Ges. Physiol. exp. Pharm.*, 1929, **49**, 615.
- [11] BURTON, T. SIMPSON et MILLARD C. MARSH. *Inter. Contr. to the Cancer in honor J. Ewing Philadelphie*, 1931, 119 et *Bull. Inst. Pasteur*, 1932, **30**, 798.
- [12] M. ROTHERMUNDT et K. BURSCHKIES. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1936, **87**, 445.
- [13] PFANNENSTIEL et SCHARLOU. *Centralbl. Parasit.*, 1929, **110**, 84.
- [14] A. TCHAKIRIAN. *Ann. de Chimie.*, 1939, **12**, 415.
- [15] H. J. BACKER et F. STIENSTRA. *Recueil Trav. Chim. P. B.*, 1933, **52**, 1033 ; SCHWARZ, REINHARDT et LEWINSOHN. *Ber.*, 1932, **65**, 1746.
- [16] W. GEILMANN et K. BRÜNGER. *Biochem. Z.* 1935, **275**, 387 et *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen Math. Physik, Kl.*, 1932, 249.
- [17] A. GOSSET, J. MACROU et A. TCHAKIRIAN. *C. R. Acad. Sc.*, 1934, **198**, 1097.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 7 mai 1942.

COMMUNICATIONS (*SUITE ET FIN*)

SUR LA STRUCTURE DES PARACRISTAUX DE LA MOSAÏQUE DU TABAC EXAMINÉS A L'ULTRAMICROSCOPE

par P. LÉPINE et P. JEANTET.

La forme et l'aspect microscopique en lumière transmise des paracristaux obtenus par Stanley dans la préparation du virus de la mosaïque du tabac à l'état de protéine purifiée sont familiers à tous. Nous avons eu l'occasion de constater que ces mêmes paracristaux examinés au microscope sur fond noir présentaient un aspect inattendu, qui traduit leur structure mésomorphe, aujourd'hui couramment admise.



FIG. 1.

La souche française qui a servi à nos essais a été isolée par l'un de nous. Le matériel virulent originel (feuilles de *Nicotiana tabacum*) provenait d'une plantation contaminée de la région de Milly (Seine-et-Marne) et nous a obli-

geamment été adressé par la Régie des Tabacs. Le virus a été isolé en suivant la technique de Gratia et Manil (1) combinée à celle de

(1) A. GRATIA et P. MANIL, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 423.

Stanley (2). Finalement concentré par hypercentrifugation, le virus a subi 5 précipitations successives par le sulfate d'ammonium acétifié, alternant avec la remise en solution dans un tampon à pH 7,2.

L'aspect macro- et microscopique des cristaux en aiguilles de Stanley que nous avons obtenus est typique. Par contre, examinés sur fond noir (ultra-microscope), l'aspect des cristaux est bien différent. Ils apparaissent comme formés de la conglomération en faisceaux parallèles d'éléments effilés de taille plus réduite, mesurant (d'après mensuration sur le cliché original d'un grossissement de 1.050) de 7 à 10 μ \times 0,3 à 0,6 μ pour les plus grands, les plus petits ayant de 0,4 à 1,8 μ (fig. 1).

Cet arrangement fasciculé, si nettement visible, illustre bien le schéma désormais classique de Bernal et Fankuchen (3). Il résulte de la disposition nématique des molécules dans les paracristaux de Stanley.

Il n'est pas sans intérêt de constater que les figures que nous avons ainsi obtenues reproduisent, agrandie à l'échelle microscopique, la structure à l'échelle moléculaire que nous avons pu observer sur les clichés d'hypermicroscopie électronique de von Borries et E. et H. Ruska présentés par M. Levaditi à notre séance du 6 novembre 1941.

(Institut Pasteur.)

Séance du 4 juin 1942.

Présidence de M. JACQUES TRÉFOUËL.

COMMUNICATIONS

FERMENTATION DE LA CELLULOSE PAR *TERMINOSPORUS THERMOCELLULOLYTICUS*

(POCHON 1942)

RENDEMENT EN GLUCOSE ET EN ALCOOL

par J. POCHON.

Nous avons exposé ici, le 3 mars dernier, le résultat de recherches ayant abouti à l'isolement d'une espèce cellulolytique thermophile nouvelle : *Terminosporus thermocellulolyticus*. Il s'agit essentiellement d'un anaérobie qui, dans les conditions optima de culture à 60-65°,

(2) W. M. STANLEY, *Ergeb. Physiol.*, 1937, **39**, 294.

(3) J. D. BERNAL et FANKUCHEN, *Nature*, 1937, **139**, 923.

fait fermenter 95 p. 100 de la cellulose du milieu avec formation d'acides volatils (acides acétique et butyrique en parties égales) et de gaz. Ainsi que nous l'annoncions, nous nous sommes depuis attaché à étudier l'action de certaines modifications des conditions de culture sur le rendement en alcool et en glucose, corps qui n'apparaissent normalement qu'à l'état de traces.

Dans le métabolisme de la fermentation réalisée en conditions optima, le glucose, terme intermédiaire d'hydrolyse de la cellulose, est intégralement transformé par les corps microbiens en acides et en gaz, et n'apparaît pas dans le milieu de culture. Si, à l'acmé de la fermentation, on ajoute au milieu un antiseptique qui arrête le métabolisme bactérien, mais laisse agir l'endocellulase des bactéries fixées sur les fibres, on voit apparaître du glucose qui s'accumule dans le milieu (1). Nous avons pu, avec cette méthode, en utilisant le toluène comme antiseptique, obtenir des rendements en glucose de l'ordre de 20 à 50 p. 100 de la cellulose mise en fermentation (papier). La réaction doit être maintenue au voisinage de la neutralité, une acidification du milieu, favorable pour d'autres germes cellulolytiques [*Pl. cellulolyticum*] (2) abaisse considérablement le rendement. Les taux que nous avons obtenus dépassent de beaucoup ceux signalés par Scott, Fred et Peterson (3) avec *Terminosporus thermocellus*. Signalons que, dans ces conditions, le rendement en acides volatils est considérablement diminué ; le rendement en alcool reste très faible.

C'est, en effet, avec une tout autre technique de culture que, utilisant la même souche, nous avons pu obtenir des proportions importantes d'alcool dans le milieu. En commençant la culture en anaérobiose, puis, à l'acmé de la fermentation, en passant au contraire à une aérobiose aussi poussée que possible, nous avons obtenu des rendements en alcool de l'ordre de 10 p. 100 de la cellulose mise en fermentation. Dans ces conditions, le taux des acides est légèrement diminué ; il n'y a pas trace de glucose. Ce rendement est sensiblement équivalent à ceux obtenus par Perwozwansky et Tschestowa (4). Le principe de la technique que nous avons utilisée est d'ailleurs en contradiction avec les observations de Veldhuis, Christensen et Fulmer (5) qui, opérant avec une culture impure, obtiennent une baisse du rendement en alcool en aérobiose ; il est probable que, dans ce cas, les aérobies associés utilisent l'alcool formé.

Quoi qu'il en soit, ces recherches montrent, du point de vue théorique, la très grande plasticité de la fermentation de la cellulose : le métabolisme d'une même souche peut être orienté dans des directions très différentes ; du point de vue pratique, elles vérifient les résultats, obtenus par des techniques sous brevets, signalés par les auteurs allemands et américains, pour l'obtention directe d'alcool, par voie biologique, à partir de la cellulose.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

(1) PRINGSHEIM, *Zentralbl. Bakt.*, II, 1913, **38**, 513.

(2) POCHON, ces *Annales*, 1935, **55**, 676.

(3) SCOTT, FRED et PETERSON, *Ind. Eng. Chem.*, 1930, 731.

(4) PERWOZWANSKY et TSCHESTOWA, *Microbiologia*, 1936, **5**, 388.

(5) VELDHIJS, CHRISTENSEN et FULMER, *Ind. and Eng. Chem.*, 1936, 430.

SUR LA SPÉCIFICITÉ DU FACTEUR V

ABSENCE D'ACTIVITÉ DE L'ALLOXAZINE-ADÉNINE-DINUCLÉOTIDE POUR *HEMOPHILUS PARAINFLUENZAE*

par ANDRÉ et MARGUERITE LWOFF.

Les substances thermolabiles nécessaires à *Hemophilus parainfluenzae* et à *Hemophilus influenzae* [Davis, 1917 (1)], le facteur V de Thjötta et Avery (2) ont été identifiées aux coenzymes I et II [A. et M. Lwoff, 1936-1937 (3)]; celles-ci possèdent les mêmes propriétés que le facteur V et les solutions de ces corps à l'état pur peuvent remplacer les extraits de levure ou le sang pour la culture *in vitro* du bacille de Pfeiffer.

Ni l'acide, ni l'amide nicotiques, ni l'acide adénylique (de muscle ou de levure) ne peuvent remplacer le facteur V. Les essais négatifs, réalisés en eau peptonée, que l'on sait aujourd'hui être riche en nicotinamide, démontrent que le bacille de Pfeiffer est incapable de synthétiser les codéshydrogénases à partir de l'acide adénylique et de la nicotinamide.

En 1938, Warburg et Christian (4) ont obtenu à l'état pur le cofacteur de l'oxydation de la *D*-alanine et établi sa constitution : il s'agit d'une alloxazine-adénine-dinucléotide que l'on peut considérer, d'après la formule hypothétique de Baumann et Stare (5), comme très voisine d'une cozymase dans laquelle la nicotinamide serait remplacée par l'alloxazine. On était donc en droit de se demander si le cofacteur de l'acide-amino-oxydase ne pourrait remplacer le facteur V pour la croissance des *Hemophilus*.

Le milieu de base a la constitution suivante :

Protéose peptone Difco	20 g.
Eau distillée	1.000
Soude	Q. S. pour pH 7,4

L'alloxazine-adénine-dinucléotide a été utilisée sous forme d'un produit pur que nous devons à l'obligeance du professeur Otto Warburg ; elle a été stérilisée par filtration sur bougie Chamberland L-3 (il n'y a pas d'adsorption notable) et ajoutée au milieu de telle sorte que sa concentration soit de 1 p. 200.000.

Les souches (*Hemophilus parainfluenzae* n° 4101 de la collection du Lister Institute) subissent d'abord deux passages en eau peptonée + extrait de levure — apportant le facteur V — puis un passage en eau peptonée seule, pour éliminer l'excès de facteur V.

(1) D. J. DAVIS, *J. inf. Dis.*, 1917, **21**, 392.

(2) T. THJÖTTA et O. T. AVERY, *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1920, **18**, 197 ; *J. exp. Med.*, 1921, **34**, 97 et 455.

(3) A. LWOFF et M. LWOFF, *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **203**, 520 et 896 ; *ibid.*, 1937, **204**, 1510 ; *Proceed. Roy. Soc. London*, Séries B, 1937, **122**, 352 ; ces *Annales*, 1937, **59**, 129.

(4) O. WARBURG et W. CHRISTIAN, *Naturwiss.*, 1938, **26**, 201.

(5) C. A. BAUMANN et F. J. STARE, *Physiol. Rev.*, 1939, **19**, 353.

A partir d'une telle culture-souche de vingt-quatre heures (à 37°), on ensemence le milieu :

1. Sans addition : témoin	0
2. + facteur V (sous forme de cozymase pure)	+
3. + alloxazine-adénine-dinucléotide	0
4. + alloxazine-adénine-dinucléotide + facteur V	+

Il n'y a pas de développement dans le tube 1 ; l'ensemencement n'a donc pas apporté de facteur V. Il n'y a pas de développement dans le tube 3 ; ceci veut dire que, à la concentration utilisée (1 p. 200.000), le coferment de l'amino-acide-oxydase est incapable de remplacer le facteur V, encore actif à une dilution de 1 p. 270.000.000. Le développement qui se produit dans les tubes 2 et 4 montre : 2, que l'ensemencement a apporté des germes viables ; 4, que l'alloxazine-adénine-dinucléotide est dépourvue d'action inhibitrice.

Des résultats identiques ont été obtenus en eau peptonée additionnée de glucose.

Nos expériences montrent donc que l'alloxazine-adénine-dinucléotide ne peut remplacer les coenzymes I et II comme facteur de croissance pour *Hemophilus parainfluenzae*.

(Service de Physiologie microbienne, Institut Pasteur.)

ÉTUDES SUR LE POUVOIR ANTISULFAMIDE

III. — QUELQUES ASPECTS CHIMIQUES DU POUVOIR ANTISULFAMIDE DES PEPTONES : HYDROLYSE

par J. TABONE, F. NITTI et H. MOUSSET.

Les substances servant de support à l'activité antisulfamide des peptones ont une vitesse de dialyse très faible (1). Ce fait nous a conduits à penser qu'il pouvait exister une relation entre la structure peptidique des peptones et leur activité antisulfamide. C'est afin de vérifier la validité de cette hypothèse que nous avons abordé dans ce travail l'étude de l'évolution du pouvoir antisulfamide des peptones au cours de leur hydrolyse.

TECHNIQUE ET RÉSULTATS.

250 c. c. d'une solution renfermant 50 g. de peptone et 100 c. c. d'HCl concentré sont placés dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux. Le ballon plonge dans un bain-marie à l'ébullition. Les prises d'essai sont neutralisées puis amenées à une concentration identique (correspondant à 5 p. 100 de peptone). On détermine sur ces prises d'essai le pouvoir antisulfamide et l'N aminé dosable au Van Slyke. La figure 1 reproduit les résultats obtenus. Le pouvoir antisulfamide baisse considérablement au cours de l'hydrolyse. La baisse est d'abord brusque puis modérée, enfin sensiblement nulle. Remarquons, sur la figure 1, qu'à la baisse du pouvoir antisulfamide correspond l'augmentation de l'azote aminé et qu'à la stabilisation du pouvoir antisulfamide correspond la constance de l'N aminé.

(1) J. TABONE et F. NITTI, *Ass. Micr. L. Franç.*, ces *Annales*, 1942, **68**, 360.

DISCUSSION DES RÉSULTATS. — Ces résultats peuvent s'interpréter en disant qu'il existe dans les peptones un pouvoir antisulfamide labile (95 pour 100 du pouvoir antisulfamide total) et un pouvoir antisulfamide stable (5 pour 100 du pouvoir antisulfamide total). On peut aussi admettre qu'il n'existe dans les peptones que le seul pouvoir antisulfamide labile, le pouvoir antisulfamide stable ayant son origine dans les produits de décomposition des substances antisulfamides labiles. La coïncidence entre la chute du pouvoir antisulfamide et l'augmentation de l'N aminé permet d'envisager entre autres hypothèses, celle selon laquelle il existerait nécessairement un rapport entre la structure peptidique des peptones et leur pouvoir antisulfamide. Si cette hypothèse devait être retenue il faudrait rechercher si le pouvoir antisulfamide des peptones est dû à l'existence d'un peptide hautement spécifique ou à un ensemble de peptides jouissant de propriétés physico-chimiques communes. Dans la première éventualité une partie infime des peptones

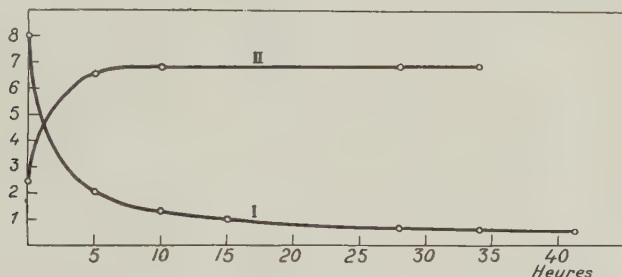


FIG. 1. — On porte en abscisse la durée de l'hydrolyse exprimée en heures et en ordonnée pour la courbe I le pouvoir antisulfamide exprimé en gouttes d'une solution au centième de 4.162 et pour la courbe II le volume d'N aminé dosable au Van Slyke.

serait à l'origine du pouvoir antisulfamide. Dans la seconde éventualité une partie, peut-être notable, des peptones interviendrait dans la production de leur qualité antisulfamide. Ces deux éventualités s'accroissent très bien des résultats déjà publiés (1), relatifs à l'évolution du pouvoir antisulfamide des peptones au cours de leur acétylation. Des expériences sont en cours qui préciseront les résultats de cette étude. On se propose, en particulier, d'étudier l'évolution du pouvoir antisulfamide des peptones en se plaçant dans des conditions d'hydrolyse moins brutales que celles adoptées dans le présent travail.

IV. — QUELQUES ASPECTS CHIMIQUES DU POUVOIR ANTISULFAMIDE DES PEPTONES : DIAZOTATION

par J. TABONE, F. NITTI et H. MOUSSET.

Dans une note précédente (1) nous avons montré que le blocage de certaines fonctions aminées des peptones par des radicaux acétyles était

(1) J. TABONE et F. NITTI, *Ass. Micr. L. Franç.*, ces *Annales*, 1942, **68**, 360.

suivi d'une baisse notable du pouvoir antisulfamide. Nous nous proposons, dans le présent travail, de préciser si les fonctions amines « actives » sont des fonctions amines grasses ou des fonctions amines aromatiques et, dans ce dernier cas, s'il s'agit de la fonction amine de l'acide *p*-amino-benzoïque.

TECHNIQUES ET RÉSULTATS.

1° COPULATION DES DIAZO-PEPTONES. — a) *Comportement respectif des dérivés de copulation des peptones et de l'acide p-aminobenzoïque vis-à-vis des solvants organiques.* — Contrairement aux dérivés de copulation donnés par l'acide *p*-aminobenzoïque [méthode de Marshall (2)] les dérivés de copulation des peptones ne sont pas solubles dans l'alcool amylique. L'acide *p*-aminobenzoïque ajouté à une solution de peptone garde, dans le mélange, le caractère qui différencie son groupement aminé des groupements aminés aromatiques des peptones.

b) *Relation entre l'intensité de coloration des dérivés de copulation de différentes peptones et le pouvoir antisulfamide de ces dernières.* — Il n'existe aucun rapport entre ces deux caractéristiques d'une peptone (voir tableau I).

TABLEAU I.

	INTENSITÉ de coloration des dérivés de copulation (1)	POUVOIR antisulfamide des peptones (2)
Peptone Vaillant	18	8
Peptone Chapoteaut	34	2
Peptone Witte	40	1
Peptone arachide.	21	0,1
Peptone S.I.B.	5	0,1

(1) Ces valeurs, exprimées en graduations de l'électrophotomètre de Meunier, sont relatives à des solutions renfermant environ 4 p. 100 de peptone.
 (2) Ces chiffres expriment le nombre de gouttes d'une solution de 1,162 au centième neutralisées, après vingt-quatre heures, par V gouttes d'une solution à 15 p. 100 de la peptone neutralisée.

2° HYDROLYSE DES SELS DE DIAZONIUM DES PEPTONES ET DES SELS DE DIAZO-AMIDE OBTENUS À PARTIR DES HYDROLYSATS DE PEPTONES (ACTIVITÉ ANTISULFAMIDE DES NOUVEAUX DÉRIVÉS). — Tandis que l'acide *p*-aminobenzoïque après diazotation et chauffage à 100° perd complètement son pouvoir antisulfamide, les peptones et leurs hydrolysats, traités de la même façon, gardent très sensiblement leur activité initiale (voir tableau II). Dans le cas du mélange peptone (ou hydrolysate de peptone) + acide *p*-aminobenzoïque, le pouvoir antisulfamide baisse considérablement après diazotation et chauffage. Cependant le pouvoir antisulfamide résiduel du mélange est supérieur à celui de la peptone (ou de l'hydrolysate de peptone). Une faible quantité d'acide *p*-aminobenzoïque échappe, en effet, à la diazotation quand celle-ci se fait en présence de peptone (ou d'hydrolysate de peptone). Cette quantité évaluée selon la

(2) MARSHALL, *J. biol. Chem.*, 1939, **128**, 537.

TABLEAU II.

Peptone (1)	4	Hydrolysats de peptone	0,2
Peptone après diazotation et chauffage (2)	4	Hydrolysats de peptone après diazotation et chauffage. . .	0,2
Peptone + acide <i>p</i> -aminobenzoïque.	40	Hydrolysats de peptone + acide <i>p</i> -aminobenzoïque.	20
Peptone + acide aminobenzoïque après diazotation et chauffage (3).	6	Hydrolysats de peptone + acide <i>p</i> -aminobenzoïque après diazotation et chauffage (2). . .	1
Acide <i>p</i> -aminobenzoïque	2	Acide <i>p</i> -aminobenzoïque	4
Acide <i>p</i> -aminobenzoïque après diazotation et chauffage (2)	0		

(1) Ces chiffres expriment le nombre de gouttes d'une solution de 1.162 au centième, neutralisée, après vingt-quatre heures, par V gouttes d'une solution à 5 p. 100, dans le cas de la peptone et de son hydrolysats, V gouttes d'une solution renfermant 15 c.c. d'acide *p*-aminobenzoïque au 1/10.000 dans 100 c.c. d'eau dans le cas de l'acide *p*-aminobenzoïque, V gouttes d'une solution renfermant pour 100 c.c., 5 g. de peptone (ou d'hydrolysats de peptone) et 15 c.c. d'acide *p*-aminobenzoïque au 1/10.000 dans le cas du mélange de peptone (ou hydrolysats de peptone) + acide *p*-aminobenzoïque.

(2) Les solutions, après diazotation, sont exactement neutralisées.

(3) On a vérifié, préalablement, que l'acide *p*-aminobenzoïque ne présente après diazotation et chauffage aucune action bactériostatique ou antiseptique.

technique de Marshall est très faible et, fait important sur lequel on aura l'occasion de revenir, cette quantité est bien plus petite que celle qui justifierait la différence qui existe entre le pouvoir antisulfamide du mélange peptone (ou hydrolysats de peptone) après diazotation et chauffage et celui de la peptone seule (ou de l'hydrolysats de peptone). Remarquons également la valeur extrêmement élevée du pouvoir antisulfamide du mélange peptone (ou hydrolysats de peptone) + acide *p*-aminobenzoïque. Il est environ sept fois supérieur à la somme des pouvoirs antisulfamides des deux constituants dans le cas du mélange : peptone + acide *p*-aminobenzoïque et cinq fois supérieur dans le cas du mélange : hydrolysats de peptone + acide *p*-aminobenzoïque.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Le fait que la coloration développée par les solutions de peptone après diazotation et copulation n'est pas soluble dans l'alcool amylique plaide en faveur de l'absence dans les peptones d'acide *p*-aminobenzoïque libre.

Le fait que le pouvoir antisulfamide des peptones ne varie pas après diazotation et qu'il n'existe aucun rapport, chez les différentes peptones essayées, entre leur pouvoir antisulfamide et l'intensité de coloration de leurs dérivés de copulation, confirme l'hypothèse précédente, permet de supposer que l'acide *p*-aminobenzoïque n'est pas engagé dans un peptide dans lequel il constituerait le chaînon terminal, le groupe aminé de l'acide *p*-aminobenzoïque restant libre, et rend enfin vraisemblable l'hypothèse selon laquelle les fonctions amines aromatiques n'interviennent pas dans la production de la qualité antisulfamide des peptones. Par voie de conséquence on en déduit que les fonctions amines, qui jouent un rôle prédominant dans le phénomène qui nous intéresse, sont des fonctions amines grasses.

Enfin, le fait que les hydrolysats de peptone gardent leur pouvoir

antisulfamide initial après diazotation tend à nous faire admettre que l'acide *p*-aminobenzoïque n'est pas, non plus, à l'intérieur d'un peptide dans une position telle que son groupement aminé se trouve engagé dans une liaison peptidique.

V. — ACTIVITÉ EXALTANTE DES PEPTONES SUR LE POUVOIR ANTISULFAMIDE DE L'ACIDE PARA-AMINOBENZOÏQUE DOSAGE DES ANTISULFAMIDES

par F. NITTI, J. TABONE et H. MOUSSET.

L'acide para-aminobenzoïque inhibe, *in vitro*, l'action bactériostatique du sulfamide.

A des degrés différents la peptone elle-même possède des propriétés antisulfamides.

Dans le pouvoir antisulfamide des peptones on doit considérer deux faits distincts : le pouvoir antisulfamide propre et le pouvoir exaltant. Le pouvoir antisulfamide propre de la peptone est relativement assez fragile et il est diminué de 95 p. 100 par une hydrolyse acide très poussée. Le pouvoir exaltant est, par contre, beaucoup plus résistant. Nous appelons « pouvoir exaltant » d'une peptone une propriété très curieuse de ces corps. *La peptone exalte « in vitro » l'action antisulfamide de l'acide para-aminobenzoïque.* Pour donner un exemple : isolément, un γ d'acide para-aminobenzoïque, ou 5 mg. de peptone Chapoteaut inhibent l'action bactériostatique de 500 γ de para-aminophénysulfamide. Si, par contre, on fait agir en même temps ces deux corps, l'effet, au lieu de s'additionner, se potentialise, et au lieu d'inhiber au total 1 mg. de sulfamide, le mélange neutralise l'action de 6 à 7 mg. de sulfamide.

Ce pouvoir exaltant des peptones pour l'acide para-aminobenzoïque se montre extrêmement résistant. Il est à peine diminué de 20 p. 100 par une hydrolyse acide très poussée. Il semble donc que pouvoir antisulfamide et pouvoir exaltant peuvent être dissociés, et qu'une peptone ayant un faible pouvoir antisulfamide peut garder un pouvoir exaltant élevé.

Ce pouvoir exaltant des peptones pour l'acide para-aminobenzoïque mérite d'attirer l'attention. Il nous montre, entre autres, que dans le dosage biologique des peptones, par exemple, nous obtenons des chiffres par trop élevés. Nous évaluons dans ces corps, non pas le pouvoir antisulfamide seul, mais la résultante du pouvoir antisulfamide et du pouvoir exaltant.

Enfin, la notion de l'action exaltante peut nous permettre de formuler une hypothèse. Nous savons que la plupart des germes sécrètent *in vitro* des antisulfamides. Il est donc possible qu'une peptone n'ayant qu'une action exaltante sans avoir de pouvoir antisulfamide propre, puisse devenir fortement antisulfamide en présence d'un germe sécrétant de faibles quantités d'antisulfamide.

Les variations dans la sensibilité des différentes espèces microbiennes pour la peptone et l'acide para-aminobenzoïque pourraient nous confirmer dans cette première hypothèse.

Nous présentons enfin une méthode de dosage biologique des anti-sulfamides.

Nous avons déjà vu que le degré d'intensité de l'action inhibitrice de l'acide *p*-aminobenzoïque varie avec le germe, les conditions de culture, le pH des milieux.

Pour le bacille *Proteus vulgaris*, cultivé dans un milieu synthétique, dont nous avons signalé par ailleurs la formule (1), une molécule d'acide para-aminobenzoïque inhibe l'action de 500 molécules de sulfamide.

Lorsqu'on veut appliquer cette notion au dosage biologique des anti-sulfamides, il est tout d'abord nécessaire de s'assurer que ce rapport $\frac{\text{antisulfamide}}{\text{sulfamide}}$ reste bien le même pour des taux très différents de sulfamide.

Nous avons pu constater que ce rapport demeure constant pour des milieux ayant une concentration en sulfamide de 1/50.000 à 1/1.000 et qu'il peut être exprimé par une fonction linéaire. Pour des concentrations supérieures, la courbe tend à s'infléchir vers l'axe des abscisses et le rapport $\frac{\text{antisulfamide}}{\text{sulfamide}}$ diminue. Par conséquent, il est nécessaire, pour un dosage très précis, d'opérer avec une dilution de l'antisulfamide comprise dans les limites que nous venons d'indiquer.

La méthode de dosage que nous utilisons est la suivante :

LA SOUCHE MICROBIENNE. — Bacille *Proteus vulgaris* X 19 entretenue depuis plusieurs mois en milieu synthétique et à 37°. Pour le dosage on utilise une culture de vingt-quatre heures ; elle est diluée, et chaque tube reçoit 3 millions environ de germes.

LE MILIEU. — Nous en avons indiqué précédemment la composition (1). Le pH est ajusté à 7,4 et le milieu est distribué dans des tubes de 17 mm. de diamètre à raison de 5 c. c. par tube.

LE DOSAGE PROPREMENT DIT. — La méthode de dosage consiste dans la recherche du pouvoir neutralisant d'une quantité fixe d'un corps anti-sulfamide vis-à-vis de doses variables de sulfamide. On établit dans la même expérience une série identique où l'antisulfamide à l'étude est remplacé par une quantité fixe d'acide para-aminobenzoïque. Ceci permet d'exprimer le pouvoir anti-sulfamide d'un corps donné en acide para-aminobenzoïque.

Dans les premiers essais on pratiquera ces dosages sur des séries de 14 tubes contenant de 60 γ à 10.000 γ de para-aminophényl sulfamide. Dans un deuxième temps on referra, si nécessaire, ces dosages en diluant le corps à étudier et en le dosant dans la zone entre 60 et 5.000 γ , zone, comme nous l'avons précédemment indiqué, où le coefficient de neutralisation $\frac{\text{antisulfamide}}{\text{sulfamide}}$ reste inchangé.

Après avoir été ensemencés, les tubes sont placés à l'étuve à 37° et la lecture est faite au bout de vingt-quatre et quarante-huit heures. On considère que le premier tube, où la neutralisation du sulfamide par

(1) F. NITTI et J. TABONE, *Ass. Micr. L. Franç.*, ces *Annales*, 1942, **68**, 360.

l'antisulfamide est complète, indique le chiffre d'antisulfamide. Ce chiffre peut être exprimé en acide para-aminobenzoïque.

Dans la méthode que nous venons d'indiquer on dose une quantité fixe d'antisulfamide vis-à-vis de quantités variables de para-aminophénylsulfamide. On peut utiliser la méthode inverse : les résultats seront comparables.

Ayant précisé ces quelques points de la technique de dosage des antisulfamides, nous voudrions insister sur l'activité antisulfamide de certaines substances biologiques et notamment des peptones.

Le pouvoir antisulfamide des peptones est extrêmement variable. Voici, par exemple, quelques résultats (exprimés en acide para-aminobenzoïque par gramme de peptone) :

Peptone Vaillant 5C	800
Peptone Chapoteaut	200
Peptone de Witte	400
Peptone d'arachide	10
Peptone Sib (2)	2

Il est à noter que les peptones les plus dégradées semblent posséder le pouvoir antisulfamide le plus élevé. Ces peptones contiennent, d'autre part, des dérivés diazotables qui peuvent être dosés par la méthode de Marshall, mais l'intensité de coloration ne s'est pas montrée proportionnelle à la valeur antisulfamide. Nous avons signalé par ailleurs ce fait (3).

L'activité d'un certain nombre de produits biologiques a été recherchée et notamment celle du sérum sanguin de cheval. Or, le sérum n'a pas d'activité antisulfamide propre mais l'acquiert après hydrolyse acide.

(*Institut Pasteur.*)

Séance du 2 juillet 1942.

Présidence de M. A.-R. PRÉVOT.

COMMUNICATIONS

SUR QUELQUES NOUVEAUX CARACTÈRES DIFFÉRENCIANT LES BACILLES DE LA PESTE ET DE LA PSEUDOTUBERCULOSE DES *PASTEURELLA*

par G. GIRARD.

Si le coccobacille de Yersin et celui de Malassez et Vignal, dont on sait l'étroite parenté, restent pour beaucoup d'auteurs étrangers

(2) Peptone bactériologique italienne conservée depuis trente ans au laboratoire. Elle est en parfait état de conservation.

(3) J. TABONE, F. NITTI et H. MOUSSET, *Ass. Micr. L. Franç.*, ces *Annales*, 1942, 68, 472.

classés dans le genre *Pasteurella* depuis le mémoire de Lignières sur les septicémies hémorragiques (1900), il n'en est pas de même en France. C. Truche distingue la *Pasteurella* humaine du bacille de Yersin par les caractères suivants :

« *Pasteurella* présente la forme en coccus plus nettement que le bacille pesteux ; elle prend très rarement une forme allongée. Elle se développe plus facilement à 38° que le bacille de Yersin. Elle est pathogène pour le lapin et le pigeon qui sont réfractaires à la peste (1). Le sérum antipesteux, même employé à fortes doses, ne possède aucune action préventive contre les infections expérimentales par *Pasteurella*. Le sérum antipesteux n'agglutine pas les *Pasteurella* et le sérum anti-pasteurella n'agglutine pas le bacille pesteux. Les sérums spécifiques correspondant au bacille pesteux ou à *Pasteurella* dévient le complément seulement en présence du germe qui leur correspond » (in *Traité de Microbiologie* de Nattan-Larrier, 1934, 2, 607).

A ces caractères, on pourrait en ajouter d'autres depuis longtemps classiques, notamment l'aspect des cultures en bouillon, les dimensions des éléments beaucoup plus volumineux chez les bacilles pesteux et pseudotuberculeux que chez *Pasteurella*, la disposition en chaînettes, spécifique pour les deux premiers, dans les cultures en milieux liquides, la fermentation du saccharose propre aux *Pasteurella*.

Le point de vue de C. Truche est aussi celui d'E. Dujardin-Beaumetz exprimé dans un travail de Lévy-Bruhl (2) où cet auteur apporte un nouvel argument en faveur de la différenciation : l'absence d'antigène glucido-lipidique dans les bacilles de Yersin et de Malassez, sa présence dans *Pasteurella*. Nous avons confirmé cette donnée récemment pour ce qui est de l'absence d'antigène complet chez les bacilles de la peste et de la pseudotuberculose (3), tandis que I. Pirowsky l'avait mis en évidence chez *Pasteurella aviseptica* (4).

A l'appui de la thèse de nos collègues, nous apportons aujourd'hui de nouveaux éléments :

1° Les bacilles de la peste et de la pseudotuberculose *poussent normalement en eau de levure et en eau de pomme de terre*, milieux impropres au développement des *Pasteurella*, fait bien connu et mis à profit pour l'identification des *Pasteurella* en pathologie vétérinaire.

2° Le sérum antipesteux ajouté aux filtrats de culture en bouillon de bacilles pesteux provoque rapidement une floculation [G. Ramon (5)]. Le même phénomène se produit avec des filtrats de culture de bacilles de Malassez. La réaction est beaucoup plus marquée si l'on emploie des extraits de culture sur gélose obtenus après congélation et décongélation suivant la technique de Gory et Grasset.

Or, dans des conditions expérimentales identiques, *on n'observe rien*

(1) Tout en étant moins sensible à la peste expérimentale que les petits rongeurs, le lapin n'est pas réfractaire à l'inoculation des cultures de haute virulence. D'autre part, la peste spontanée ne l'épargne pas toujours au cours des épizooties murines et nous en avons signalé deux exemples à Madagascar. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1928, **21**, 299, et 1934, **27**, 962.

(2) M. LÉVY-BRUHL, *Rev. Path. comp.*, 1938, n° 506, 1241.

(3) G. GIRARD, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1577.

(4) I. PIROWSKY, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 98.

(5) G. RAMON, *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **179**, 485.

de pareil avec les filtrats de cultures de « *Pasteurella* » additionnées de sérum antipesteux.

3° Les bactériophages antipesteux et antipseudotuberculeux sont sans action à l'égard des « *Pasteurella* ». Le pouvoir inhibiteur du phage antipesteux que nous n'avons jamais vu en défaut depuis quinze ans avec de multiples échantillons de bacilles de Yersin de toutes origines (150 environ) est nul vis-à-vis des *Pasteurella*. En revanche, cette inhibition se manifeste avec certaines souches de pseudotuberculose, au même titre qu'avec le phage antipseudotuberculeux (6). Nos constatations diffèrent sur ce point de celles de T. Sugino (7) qui souligne bien la polyvalence du bactériophage antipesteux, mais strictement limitée au bacille de Yersin, à l'exclusion de tous autres germes, *Pasteurella* et pseudotuberculeux compris.

En résumé, le développement des bacilles pesteux et pseudotuberculeux en eau de levure et en eau de pomme de terre, l'absence de floculation du mélange sérum antipesteux-filtrat de culture de *Pasteurella*, l'absence totale de lyse des *Pasteurella* par un bactériophage antipesteux dont la polyvalence et l'activité sont très marquées, ajoutent encore au faisceau d'arguments invoqués pour séparer des *Pasteurella* le bacille de Yersin et celui de Malassez et Vignal. Que leur reste-t-il, en effet, de commun ? La coloration bipolaire, au nom de laquelle ils ont été jadis intégrés dans le même genre. Reconnaissons que ce caractère n'a aujourd'hui rien de spécifique.

Par contre, les bacilles de Yersin et de Malassez et Vignal apparaissent de plus en plus étroitement liés par une communauté antigénique qui justifie pleinement l'expression de E. Dujardin-Beaumetz : « La peste, c'est une pseudotuberculose », définition qui s'oppose à celle de Lignières : « La peste, c'est la pasteurellose humaine » (Lévy-Bruhl, *loc. cit.*).

Nos recherches ont porté sur 11 souches de *Pasteurella* dont 9 provenaient du lapin, 1 du porc, 1 du canard. Elles nous ont été aimablement fournies par M. Truche à qui nous adressons nos vifs remerciements. Nous sommes également redevables à notre collègue de plusieurs souches de pseudotuberculose dont 12 ont été étudiées en même temps que 10 souches de bacilles pesteux.

(Institut Pasteur, Service de la Peste.)

(6) La question de la différenciation du bacille pesteux et du bacille de Malassez et Vignal ne s'est jamais pratiquement posée pour nous à Madagascar où la pseudotuberculose des rongeurs est inconnue. L'addition d'une goutte de bactériophage antipesteux est le moyen le plus rapide et le plus sûr dont nous disposons pour l'identification et le contrôle de pureté des cultures de peste. En France, comme partout ailleurs où la pseudotuberculose existe, l'action empêchante d'un phage antipesteux ne suffirait pas à affirmer que le germe incriminé est bien un bacille pesteux.

(7) T. SUGINO, *Kitasato Arch. exp. Med.*, 1932, 9, 73.

CARACTÉRISATION DE CERTAINES TOXINES ET ANATOXINES PAR LEUR FLUORESCENCE EN LUMIÈRE DE WOOD

par J. LOISELEUR et R.-O. PRUDHOMME.

Dés phénomènes analogues à ceux rapportés pour les acides aminés (1) s'observent également au cours de la formolisation des toxines. Bien que la complexité de ces milieux ne permette dans ce cas que des observations d'une valeur très relative, l'ensemble des faits apporte des renseignements sur la transformation des toxines en anatoxines.

I. — Pour ce qui concerne le pouvoir rotatoire, les mesures sont dénuées de signification du fait de la complexité du milieu où la toxine ne constitue pondéralement qu'une faible fraction et aussi parce que ces milieux contiennent, en dehors des protéides, des hydrates de carbone et d'autres constituants qui présentent la mutarotation.

Par contre, les mesures de fluorescence sont susceptibles de donner quelques indications. Beaucoup de milieux de culture, notamment celui utilisé pour le bacille diphtérique (2), contiennent des flavines

TABLEAU I. — **Augmentation de la fluorescence (1) des toxines formolées à 5 p. 100 au cours de leur séjour à l'étuve à 40°.**

	DURÉE DU SÉJOUR A L'ÉTUVE					
	Au départ	3 jours	7 jours	9 jours	17 jours	27 jours
Toxine tétanique du 11 avril 1942 (2).	1	(1,52)	1,41	1,44	1,80	2,56
Toxine tétanique du 8 mai 1942 . .	0,90	1,25	1,35	1,44	1,68	2,20
Toxine diphtérique du 11 mai 1942.	1,18	1,25	1,22	(1,58)	1,40	1,96
Toxine dysentérique du 14 avril 1942.	1,53	(1,33)	(1,74)	1,63	1,62	2,60
Toxine du vibrion septique	0,50	(1,46)	1,41	1,71	2,28	2,53
Toxine du <i>B. ædematiens</i>	0,80	1,30	1,37	1,45	2	2,60
Toxine du <i>B. perfringens</i>	0,50	1,41	1,93	1,97	(1,71)	2,53
Venin de vipère à 1 p. 100.	1,03	(1,53)	(1,48)	1,38	(1,06)	1,53

(1) Mesurée au spectrophotomètre. Précision : 14 p. 100.

(2) Pour toutes les toxines, les mesures sont faites avec des dilutions au 1/10.

(1) J. LOISELEUR et R.-O. PRUDHOMME, *Soc. Chim. biol.*, séance du 16 juin 1942.

(2) C. LEVADITI, G. LOISEAU, M. PAÏC, M. PHILIPPE et P. HABER, *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 609. — Ch. DHÉRÉ, P. MEUNIER et V. CASTELLI, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 564 et 1050.

TABLEAU II. — Fluorescence en lumière de Wood des toxines et des anatoxines correspondantes.

		TOXINES	ANATOXINES
Tétanique . . .	1/20	Fluorescence à peine marquée.	Fluorescence bleu intense.
Diphtérique . . .	1/50	Fluorescence jaune très légère	Fluorescence bleue.
<i>B. œdematiens</i> . .	1/20	Fluorescence jaune-vert.	Fluorescence bleu-vert.
<i>B. perfringens</i> . .	1/20	Fluorescence vert-jaune.	Fluorescence bleue.
Vibrion septique.	1/20	Fluorescence bleue.	Fluorescence bleuë.
<i>B. histolytique</i> .	1/20	Fluorescence bleue.	Fluorescence bleue.

et des porphyrines, ce qui gêne l'observation du phénomène. Mais cette observation est facilitée par le fait que l'action du formol se manifeste de deux façons. Il se produit d'une part une augmentation progressive de la fluorescence, d'autre part un déplacement de la bande de fluorescence qui passe du jaune-vert au bleu-violet. Le tableau I reproduit les variations de la fluorescence de différentes toxines formolées à 5 p. 100 (de façon à rendre plus rapide l'observation) et ramenées à pH = 7.

II. — D'autre part, on peut comparer les fluorescences des toxines et des anatoxines correspondantes, comparaison rendue plus facile par le fait que les fluorescences propres aux éléments initiaux des milieux de culture sont situées dans le jaune-vert, tandis que la fluorescence propre à l'action du formol est située dans le bleu-violet. Pour un examen microscopique, on élimine très facilement les premières de ces fluorescences par une dilution convenable. Le tableau II donne le résultat d'ensemble de cet examen macroscopique.

Le tableau II montre des différences très accusées dans le cas des anatoxines téanique et diphtérique ainsi que dans celui des deux premières des anatoxines des anaérobies : dans tous ces cas, le simple examen en lumière de Wood pourrait constituer un procédé très simple pour distinguer rapidement l'anatoxine d'une toxine.

En résumé, certains bouillons microbiens toxiques subissent, au cours de la formolisation, une transformation qui se traduit par des modifications de leur fluorescence en lumière de Wood. Ces transformations sont propres aux constituants protéiques du milieu de culture, sans que rien n'autorise encore à les attribuer à une transformation propre de la toxine. Dans certains cas, ces phénomènes sont assez nets pour constituer un procédé commode de différenciation. On pourrait encore expérimenter l'emploi des mesures de fluorescence pour suivre pratiquement la transformation d'une toxine en anatoxine.

(Institut Pasteur.)

BACTÉRIOPHAGES DU GROUPE COLI-DYSENTÉRIQUE A GRANDES PLAGES ISOLÉS DES EAUX DU BASSIN DE LA SEINE

par A. GUELIN.

La Commission scientifique du Bassin de la Seine ayant inclus dans son programme l'étude des bactériophages de l'eau, nous avons, sur la proposition de M. E. Wollman, institué, depuis un an, des recherches systématiques sur cette question. Les résultats acquis seront publiés ultérieurement.

Pour le moment nous décrirons sommairement un groupe de bactériophages isolés au cours de ces recherches et qui donnent sur gélose des plages à peu près de la taille de celles produites, dans les mêmes conditions, par le bactériophage dysentérique S 13 (F.-M. Burnet), le plus petit des facteurs lysogènes actuellement connus. Les dimensions des plages étant, dans des conditions semblables, fonction de la taille des bactériophages (Andrewes et Elford), il était probable qu'on avait affaire à de très petits bactériophages. Leur étude avait, à ce titre, un grand intérêt en vue des recherches poursuivies actuellement au laboratoire de M. Wollman sur les relations entre la taille des facteurs lysogènes et leur comportement vis-à-vis de divers agents.

Lors de l'isolement des bactériophages en question les plages sur gélose présentaient un aspect particulier : elles tranchaient à peine, par leur translucidité plus grande, sur le gazon bactérien. Au cours de passages sur les germes sensibles, la lyse s'accroissait, laissant la gélose à nu au niveau des plages avec, de temps à autre, retour à l'aspect initial.

En tout, 7 bactériophages présentant des plages de ce caractère ont été isolés : 2 sur bacille paradysentérique Y 6R (désignés pour des raisons qui apparaîtront plus loin, comme bactériophages S 14 et S 15) ; 3 sur un bacille paratyphique A [Kaufmann] (bactériophages A₁, A₂ et A₃) ; 2 sur un bacille paratyphique B (bactériophages B₁ et B₂).

Pour chacun de ces bactériophages on a étudié :

1° Le « spectre d'action », c'est-à-dire les souches qui s'avèrent sensibles parmi les germes éprouvés.

2° Le comportement vis-à-vis de ces souches rendues résistantes au bactériophage homologue.

3° Le comportement aux sérums antibactériophages.

4° L'action de la chaleur.

I. — Les 7 bactériophages ont été éprouvés vis-à-vis de toutes les souches du groupe *Coli-typique-dysentérique* employées au cours de nos recherches. Le *B. Shiga 4*, le *B. paradysentérique Y 6R*, le *B. paratyphique B* (Rouland), le *B. coli 36* se sont montrés sensibles aux 7 bactériophages en question ainsi qu'au bactériophage S 13 de F.-M. Burnet. Les bactériophages A₁, A₂ et A₃ ainsi que B₁ et B₂ se

sont montrés actifs pour le *B. paratyphique* A (Kaufmann) ; et un seul groupe (A_1 , A_2 et A_3) pour le *B. typhique* (souche Lister) ; aucun des 7 n'agissait sur le *B. coli*, souche Bruxelles. Le titre lytique de tous ces bactériophages pour les germes sensibles est à peu près le même, sauf pour le *B. paratyphique* B pour lequel il est très bas (10^2 avec les bactériophages du groupe A).

II. — La souche de *B. paratyphique* Y 6R rendue résistante au bactériophage S 13 ainsi que celle de *B. paratyphique* B rendue résistante au bactériophage B deviennent du même coup résistantes aux bactériophages S 14, S 15, B_1 et B_2 ; elles restent sensibles aux bactériophages A_1 , A_2 et A_3 .

Il nous a été impossible, jusqu'ici, d'obtenir une souche de paratyphique A résistante au bactériophage homologue.

III. — Le sérum anti-bactériophage S 13 à 1 p. 1.000 neutralisait complètement une dilution de bactériophage homologue donnant 3.000 à 4.000 plaques par goutte. La neutralisation était encore à peu près complète (à 25-80 éléments près) dans les mêmes conditions, avec les bactériophages S 14, S 15, B_1 et B_2 . Elle fait défaut, même pour du sérum à 1 p. 10 avec les bactériophages A_1 , A_2 et A_3 . Aucun des bactériophages S 13, S 14, S 15, B_1 , B_2 n'est neutralisé par le sérum antibactériophage coli 36.

IV. — Chauffés en eau physiologique, les bactériophages A_1 , A_2 et A_3 se montrent les plus thermosensibles : inactivation en quinze à vingt minutes à 55° . Il reste encore 10 p. 100 d'éléments actifs après une heure avec le bactériophage S 13 ; 14 p. 100 avec les bactériophages B_1 et B_2 , et 35 p. 100 environ avec les bactériophages S 14 et S 15.

De cet ensemble de données, il résulte que les bactériophages étudiés se répartissent en trois groupes. Le premier comprend les bactériophages S 14 et S 15 identiques — à la thermosensibilité légèrement plus faible près — au bactériophage S 13 de Burnet ; le deuxième, très voisin, comprend les bactériophages B_1 et B_2 ; le troisième comprenant les bactériophages A_1 , A_2 et A_3 , se distingue nettement des deux groupes précédents par ses caractères sérologiques, sa thermosensibilité, son spectre d'action.

Nous faisons connaître ci-dessous les résultats de recherches ayant pour but de préciser certains caractères de ces bactériophages et notamment leurs dimensions (avec MM. Rouyer et Grabar).

(Institut Pasteur.)

DIMENSIONS TROUVÉES PAR ULTRAFILTRATION DE QUELQUES BACTÉRIOPHAGES RÉCEMMENT ISOLÉS

par M. ROUYER, A. GUELIN et P. GRABAR.

La grande majorité des bactériophages dont les dimensions ont été déterminées par ultrafiltration est de taille relativement grande ; on ne connaissait jusqu'à maintenant que deux bactériophages très petits,

le S 13 de Burnet et le phage de *B. pruni* (de 8 à 12 $m\mu$), et un troisième un peu plus grand, le B 563, auquel deux d'entre nous (1) ont attribué une taille de 15 à 21 $m\mu$.

L'étude, résumée dans la présente note, avait pour but : de déterminer les dimensions de quelques bactériophages, isolés récemment par l'un de nous (2) et supposés être très petits, et de contrôler les dimensions attribuées au bactériophage du *Subtilis*. Ces bactériophages ont servi dans des études d'un ordre différent (sensibilité à la lumière visible, ultracentrifugation) et il était nécessaire de connaître leurs dimensions.

Les 4 bactériophages de petite taille étudiés sont : S 14, B_1 , B_2 et A_1 . Ils appartiennent tous au groupe coli-typhique-dysentérique. Les techniques employées ont été identiques à celles décrites par deux d'entre nous dans un travail précédent (2). Les dimensions de ces 4 bactériophages étant du même ordre de grandeur, pour pouvoir préciser d'éventuelles différences, nous avons ultrafiltré, comme nous l'avions déjà fait auparavant, des mélanges de deux bactériophages, actifs sur deux espèces bactériennes différentes. Dans le cas présent nous avons utilisé, comme témoin, le bactériophage streptococcique B 563.

Le tableau I résume un certain nombre de résultats obtenus. Nous croyons avoir le droit d'en tirer les renseignements suivants : 1° le bactériophage S 14 est nettement plus petit que le B 563 ; son point terminal de filtration est inférieur à $2R = 28 m\mu$. 2° le bactériophage B_1 est un peu plus grand que le précédent, il est retenu toujours par la membrane ayant un diamètre moyen des pores ($2R$) de 28 $m\mu$; mais ce bactériophage traverse aisément une membrane de $2R = 43 m\mu$; nous pensons que son point terminal de filtration est situé vers $2R = 30 m\mu$. 3° Le bactériophage B_2 a des dimensions analogues sinon identiques au B_1 . 4° Le bactériophage A_1 possède des dimensions analogues au bactériophage B 563. Nous avons fait figurer dans le tableau I l'expérience n° 10, bien que les résultats soient nettement aberrants et en contradiction avec les résultats obtenus normalement en ultrafiltration. Nous nous permettons de ne pas les prendre en considération, car le fait que dans cette expérience le bactériophage B 563 a traversé une membrane de $2R = 28 m\mu$ est absolument anormal. 5° Dans les expériences publiées antérieurement par deux d'entre nous, il a été admis que le bactériophage B 563 a un point terminal de filtration situé vers $2R = 58$ à 60 $m\mu$. Nous avons pu nous rendre compte depuis que ce bactériophage traverse parfois des membranes moins poreuses ; comme on peut le voir sur le tableau I, quelques éléments ont pu traverser la membrane de $2R = 43 m\mu$ dans 2 cas sur 12 expériences. Nous pensons donc que le point terminal de filtration de ce bactériophage doit être voisin de $2R = 43 m\mu$.

L'expérience nous a montré que le bactériophage dysentérique S 13 traverse quelquefois nos membranes de $2R = 28 m\mu$; son point terminal de filtration est donc sensiblement le même avec nos membranes et les membranes « Gradocol ». De ce fait, le facteur de correction F, à appliquer à nos membranes de faible porosité pour déter-

(1) P. GRABAR et M. ROUYER, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 904.

(2) M^{me} A. GUELIN, *Ass. Micr. L. Franç.*, ces *Annales*, 1942, **68**, 482.

TABLEAU I.

BACTÉRIOPHAGES	TITRE au centimètre cube	NUMÉROS des expériences	NOMBRE DE PLAGES (ramené à 1 goutte) obtenues avec des filtrats à travers des membranes de 2R, en mp, égal à					
			73	64	51	43	28	19
B 563	0,8.10 ⁹	1	lc			0	0	
		2	lc		3	0	0	0
		3	lc			0	0	
+								
		1	lc			500	0	
		2	lc		700	400	400	0
S 14	4.10 ⁷	3	lc			500	lpc	
B 563	1.10 ⁸	4				9	0	
		5	6		0	0	0	0
		6				0		
+								
		4				lc	0	
		5	lc		lc	lc	0	0
B ₁	3.10 ⁸	6				lc		
B 563	1.10 ⁸	7				0	0	
		8	150		0	0	0	0
		9				0		
+								
		7				177	0	
		8	3		0	274	0	0
B ₂	3.10 ⁸	9				lpc		
B 563	0,5.10 ⁸	10		12	0	lc	35	0
		11				0	0	
		12	800			0	0	0
		13				8	0	
+								
		10		0	0	lc	500	0
		11				0	0	
		12	10			0	0	0
A ₁	0,7.10 ⁸	13				10	0	

Remarques : lc, lyse complète ; lpc, lyse presque complète.

miner les dimensions des bactériophages, doit être plutôt de 0,3 à 0,5, que de 0,25 à 0,33, comme nous le pensions auparavant. En admettant ce facteur de correction, on pourrait attribuer aux bactériophages étudiés les dimensions suivantes : S 14 : 8 à 10 mμ ; B₁ et B₂ : 10 à 15 mμ et A₁ et B 563 : 14 à 21 mμ. Nous aurons l'occasion prochainement de revenir sur la question des dimensions à attribuer aux bactériophages et des valeurs des coefficients de correction à employer dans le calcul

TABLEAU II.

BACTÉRIOPHAGES	TITRE	NOMBRE DE PLAGES obtenues avec les filtrats à travers des membranes de 2R, en m μ , égal à				
		200	167	150	132	100
Bactériophage du <i>Subtilis</i> .	3.10^8	1c	1c		1pc	0
S3K +	$4,5.10^8$	3740	1c	1420	0	0
Bactériophage du <i>Subtilis</i> .	1.10^8	859	1c	1060	0	0

de ces dimensions, en partant des données fournies par l'ultrafiltration.

Le tableau II montre que le bactériophage du *Subtilis* peut traverser une membrane de 2R = 132 m μ et que, mélangé avec le bactériophage du staphylocoque doré S3K, il se comporte d'une manière analogue. Nous croyons donc que les dimensions du bactériophage du *Subtilis* ne sont pas de 80 à 120 m μ , comme on l'avait admis, mais qu'il faut le ranger dans le groupe des bactériophages ayant une taille de 50 à 75 m μ . Ce résultat concorde avec les observations faites au cours de l'étude de sa radiosensibilité (Wollman et Lacassagne) et les mesures de sa vitesse de sédimentation (Lépine et Nicolle).

(Institut Pasteur, Paris.)

SENSIBILITÉ RELATIVE A LA LUMIÈRE DE DIVERS BACTÉRIOPHAGES

par M. ROUYER et A. GUELIN.

L'action de la lumière sur les phages a été montrée en premier lieu par R. Wahl et A. Guélin (1) qui l'étudièrent sur deux bactériophages actifs sur le même microbe, le S13 et le C16.

Nous avons trouvé intéressant d'étendre ces recherches à quelques bactériophages, les uns nouvellement isolés (2), les autres venant de la collection du laboratoire.

Dans l'expérience de R. Wahl et A. Guélin, les phages étaient directement exposés à la lumière solaire totale dont l'intensité était très variable et qui en plus de la partie visible du spectre contient des

(1) A. GUELIN, ces *Annales*, 1942, **68**, 245.

(2) A. GUELIN, *Ass. Micr. L. Franç.*, ces *Annales*, 1942, **68**, 482.

rayons infra-rouges et ultra-violet ; toutes choses pouvant fausser les résultats de l'expérience.

Nous avons pris comme source lumineuse stable une ampoule Philips à projection de 500 watts (type n° 60) alimentée sur 110 volts redressé avec accumulateurs en tampon. Cette ampoule se trouve derrière un condensateur à deux lentilles de 10 centimètres de diamètre et de 7 centimètres de focale, de façon à projeter l'image des filaments sur le tube en expérience situé à 22 centimètres de la paroi postérieure du condensateur.

Sur le trajet des rayons lumineux on dispose deux boîtes de Roux de 5,5 cm. d'épaisseur contenant de l'alun de potasse à demi-saturation, destinées à arrêter les rayons infra-rouges.

Enfin une troisième boîte remplie d'une solution d'esculine à 0,1 p. 100 élimine tous les rayons d'une longueur d'onde inférieure à $\lambda = 4.100 \text{ \AA}$.

Cette précaution est indispensable, car le verre ordinaire laisse passer une fraction très appréciable de l'ultra-violet jusqu'à 3.750 \AA et l'expérience suivante montre leur très forte activité : Si l'on irradie du bactériophage S 13 avec la cuve à esculine interposée on a dans les conditions de l'expérience 34 p. 100 d'activité après une heure, mais si on remplace la solution d'esculine par de l'eau distillée il n'y a plus que 8 p. 100 d'éléments actifs.

Afin d'écarter l'action de la chaleur, nous avons immergé le tube contenant la suspension à irradier contre la paroi antérieure d'une cuve de verre pleine de glace et d'eau qui conserve une température constante de 6° pendant toute la durée de l'expérience.

Cette protection est très efficace, car par exemple pour le bactériophage A₁ le plus sensible à la chaleur, nous obtenons toujours, aux erreurs d'expérience près, le même nombre de plages sur les témoins du début et de la fin de l'expérience.

Disposant ainsi d'une source fixe de lumière s'étendant de 7.600 \AA pour le rouge à 4.100 \AA pour le violet ; ayant éliminé l'action de la chaleur et tous les éléments de l'appareil étant fixés, nous avons opéré sur des suspensions de bactériophages en solution de chlorure de sodium à 7,5 p. 1.000 dans de l'eau bidistillée ; ces suspensions contenaient en moyenne 2.10^{-3} éléments au cc. Les expériences portaient sur 6 cc. contenus dans des tubes de verre de 13 mm. de diamètre.

Les prélèvements étaient naturellement tous effectués avec la même pipette (5) et les titrages faits par numération des plages, les chiffres donnés étant calculés sur les moyennes de trois titrages.

Nous avons étudié dans ces conditions les bactériophages récemment isolés paradysentérique S 14, paratyphiques A 1 et B I (2) et les bactériophages de la collection paradysentérique : S 13 et C 16, Streptocoque B 563, Coli C 36, Staphylocoque doré S 3 K, Staphylocoque blanc Twort, Mégathérium 899.

Les résultats sont résumés dans les courbes ci-contre ; on voit qu'en fonction de leur sensibilité décroissante, ils se classent dans l'ordre suivant :

BACTÉRIOPHAGES	DIMENSIONS (m μ)	PROPORTION d'éléments ayant résisté à une heure d'exposition (p. 100)
Paradysentérique S13	8 à 10	22
Paradysentérique S14	8 à 10	31
Paratyphique B1	10 à 15	34
Paratyphique A1	14 à 21	42
Strepto B563	"	72
Coli C36	20 à 30	75
Mégatherium 899	30 à 40	82
Paradysentérique C16	50 à 75	85
Staphylo doré S3K	50 à 75	100
Staphylo Twort blanc	50 à 75	100

Fait intéressant, dont le travail déjà cité ne donnait qu'un exemple (1) ; l'action de la lumière sur ces bactériophages est en rapport inverse de leur taille, elle croît à mesure que celle-ci diminue.

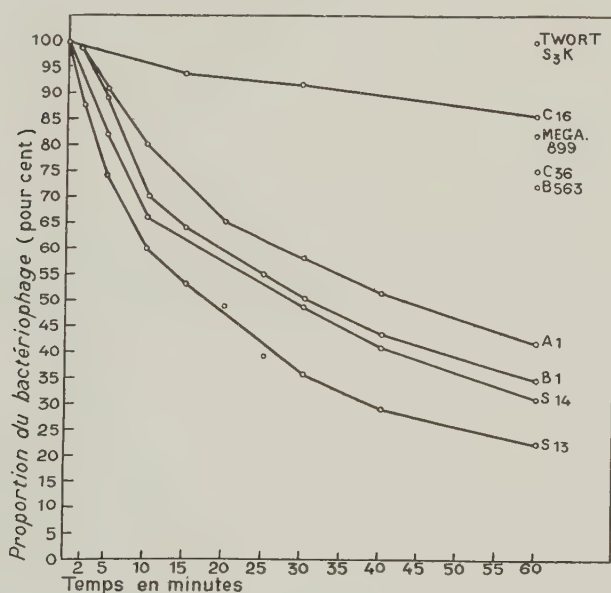


FIG. 4.

Ainsi les 10 bactériophages étudiés, bien qu'appartenant à des groupes bactériens très différents, se rangent très sensiblement dans le même ordre, qu'ils se classent suivant les dimensions qui leur sont assignées par ultra-filtration (3) ou par ultra-centrifugation. La sensibilité à la lumière des bactériophages étudiés est donc en sens inverse

(3) P. GRABAR et M. ROUYER, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 904. — M. ROUYER, A. GUELIN et P. GRABAR, *Ass. Micr. L. Franç.*, ces *Annales*, 1942, **68**, 484.

de celle des rayons ultra-violets moyens (4) ou des rayons X (5) ; elle varie dans le même sens que la thermo-sensibilité (6).

Nous nous proposons de vérifier ces résultats sur le plus grand nombre possible de bactériophages. A l'aide d'un monochromateur à optique de quartz, on pourrait déterminer la région du spectre où les bactériophages de grandes et petites tailles ont une sensibilité équivalente ; elle se trouve probablement dans la toute dernière portion de l'ultra-violet long. Ce sera l'objet de prochaines recherches.

(*Institut du Radium, Fondation Curie.*

Laboratoire de recherches sur les bactériophages, Institut Pasteur.)

DISPOSITIF OPTIQUE TRÈS SIMPLE PERMETTANT DE REPÉRER LE DÉPLACEMENT DES PROTÉIDES AU COURS DE LEUR SÉPARATION PAR ÉLECTROPHORÈSE

par MICHEL MACHEBOEUF et A.-M. MONNIER.

On connaît les très beaux résultats obtenus par Tiselius (1) avec un appareil permettant de suivre optiquement le déplacement des protéides sous l'influence d'un champ électrique. Malheureusement cet appareil comporte une tubulure à faces parallèles très coûteuse et un système optique complexe pour le repérage des frontières entre les fractions protéidiques. L'un de nous a réalisé (2) un appareil simple permettant de recueillir isolément des fractions séparées par électrophorèse, mais cet appareil ne permettait pas le repérage optique des frontières. Nous apportons ici le moyen simple d'effectuer ce repérage.

Principe. — Si des rayons lumineux, issus d'une source ponctuelle lointaine, traversent une cuve à faces parallèles contenant une colonne liquide présentant une zone d'indice de réfraction variable, ils subissent une courbure vers les indices croissants. L'ensemble des rayons ainsi déviés va se croiser, au delà de la colonne liquide, avec les rayons qui passent sans déviation dans la zone d'indice constant sous-jacente. Il en résulte une sorte de caustique, dont l'épaisseur se réduit considérablement à une certaine distance de la colonne liquide. Sur un écran placé à cette distance, on observe une strie lumineuse étroite côtoyée par une bande sombre (fig. 2), une telle strie est le signe visible de la frontière entre deux couches liquides superposées d'indices

(4) HALLAUER, *Zeitschr. Hyg.*, 1935, **417**, 18. — M. ROUYER et R.-O. PRUDHOMME, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1126.

(5) E. WOLLMAN et LACASSAGNE, ces *Annales*, 1940, **64**, 5.

(6) E. WOLLMAN et E. WOLLMAN, *C. R. Acad. Sci.*, 1940, **211**, 270.

(1) TISELIUS, *Thèse inaugurale*, Upsala, 1930 ; *Koll. Zeitschr.*, 1938, **85**, 129 ; *Trans. Faraday Soc.*, 1937, **33**, 524.

(2) M. MACHEBOEUF, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1241.

différents. Pour que la strie soit fine et nette, on doit trouver, par tâtonnements, la distance optima pour laquelle l'écran coupe la partie la plus étroite de la caustique. Cette distance est d'autant plus courte que la variation d'indice, au niveau de la frontière, est plus abrupte. S'il y a plusieurs couches liquides superposées, la mise au point peut différer pour chaque frontière.

Essai simplifié de calcul du phénomène. — Soit un rayon frappant la cuve en un point de hauteur h où l'indice varie. Le rayon s'incurve vers les régions d'indices croissants. A la sortie du tube, le rayon est dévié d'un angle D , dont la valeur est fournie par la formule suivante :

$$D = \frac{e}{n} \frac{dn}{dh}$$

e est l'épaisseur de la cuve.

n et $\frac{dn}{dh}$ sont respectivement l'indice et le gradient d'indice, au point d'incidence.

Comme dans le cas qui nous occupe, l'indice n est fort peu différent

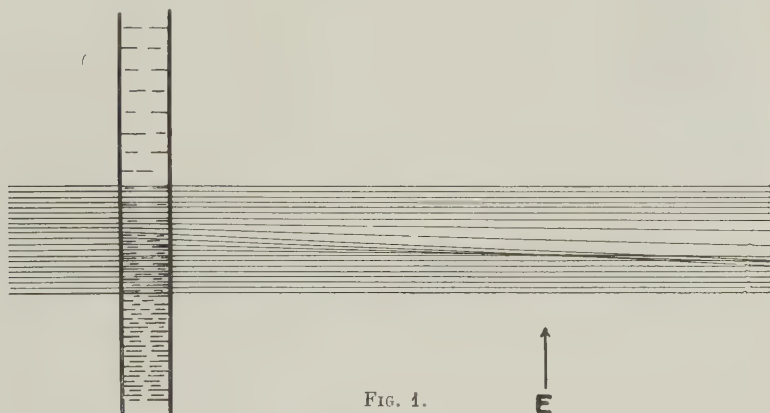


FIG. 1.

de part et d'autre de la frontière, il en résulte que l'angle D est très sensiblement proportionnel à :

$$\frac{dn}{dh}$$

Pour tracer le schéma ci-contre (fig. 1), nous avons dû faire une hypothèse au sujet de la loi de variation d'indice en fonction de la hauteur h du tube, au niveau de la frontière. Le plus simple est d'admettre une diffusion réciproque des deux liquides d'indices différents. En conséquence, l'indice n varie en fonction de h selon l'intégrale de la probabilité.

Le gradient $\frac{dn}{dh}$ varierait alors en fonction de la hauteur selon la courbe en cloche classique. Pour traiter complètement le problème, il faudrait calculer la déviation d'un grand nombre de rayons. Mais, pour

simplifier, nous n'avons considéré que 8 rayons parallèles et équidistants. Nous admettrons que ces rayons subissent des déviations respectivement proportionnelles aux nombres bien connus des artilleurs, à savoir : 2, 7, 16, 25, 25, 16, 7, 2, lesquels correspondent à des ordonnées de la courbe en cloche également espacées. C'est ainsi qu'ont été calculées les déviations des rayons représentés sur la figure 3. Ces rayons dessinent bien une sorte de caustique. Celle-ci se resserre considérablement, en un point qui correspond à l'emplacement convenable de l'écran (E.). La figure rend, en outre, évident le fait que la strie lumineuse résultant de l'intersection de la caustique est d'autant plus près du tube que la frontière, entre les deux liquides, est plus abrupte.

Réalisation. — Pour appliquer ce principe optique à un appareil à



Fig. 2

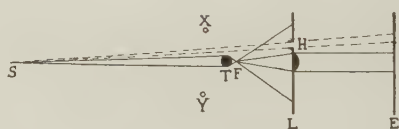


FIG. 3. — Coupe horizontale de l'appareil.

S, source lumineuse ponctuelle; T, coupe du tube cylindrique contenant le liquide étudié; F, trace de la droite focale commune au tube et à la lentille; L, coupe de la lentille cylindrique et de la plaque métallique qui l'entoure, avec en H l'échelle transparente; E, écran mobile; XY, supports verticaux du fil repère mobile horizontal; en pointillé, trajet des rayons projetant l'échelle transparente sur l'écran.

électrophorèse, il faudrait un tube à faces parallèles très onéreux. Nous sommes cependant parvenus à utiliser un vulgaire tube cylindrique de verre. Dans ce cas, les rayons convergent à très courte distance, au delà du tube, en une droite parallèle à l'axe du tube, car le tube plein de liquide se comporte sensiblement comme une lentille cylindrique. Au delà de cette ligne focale, les rayons divergent considérablement, de sorte que l'éclairement diminue très rapidement en fonction de l'éloignement de l'écran. Tel quel, ce système ne permettrait donc l'examen d'une strie lumineuse, qu'à une très petite distance de la ligne focale et il ne pourrait mettre en évidence que des frontières correspondant à de forts gradients d'indice. Pour obvier à cet inconvénient, nous avons réalisé un système cylindrique afocal en disposant une lentille cylindrique parallèle au tube, la droite focale, objet de cette lentille, étant confondue avec la droite focale image du tube. Les rayons, après avoir traversé le tube et la lentille cylindrique constituent un faisceau parallèle et l'éclairement de l'écran, quelle que soit sa distance, est toujours suffisant.

Choix du tube. — On choisit quelques tubes de verre bien rectilignes, ne présentant pas de défaut apparent à la loupe. On les remplit d'eau, puis on les fait défiler derrière la lentille cylindrique en faisant, pour chacun, coïncider la ligne focale avec celle de la lentille; on repère tous les défauts visibles sur l'écran et l'on trouve facilement une

portion de 25 cm. sans défaut. C'est cette portion que l'on utilise pour réaliser la partie ascendante d'un appareil identique à celui décrit par l'un de nous, mais en s'abstenant d'y percer des orifices de prélèvement.

Lentille. — On pourrait remplacer la lentille cylindrique par un deuxième tube de verre rempli d'eau, mais le résultat serait moins bon, car le système conduirait à employer des faisceaux de grande ouverture, d'où aberration notable. Il faudrait réduire l'ouverture des faisceaux, au moyen d'une fente verticale et la zone éclairée sur l'écran serait trop étroite. Au contraire, la lentille cylindrique, si sa distance focale est suffisante, permet d'éclairer une zone assez large, correspondant cependant à un angle d'ouverture assez faible.

Repérage. — Pour repérer les frontières, on utilise quelques artifices simples : 1° Autour de la lentille, on dispose une plaque métallique masquant les rayons inutiles ; une large fente découpée dans cette plaque, parallèlement au tube, est munie d'une glace portant des traits équidistants. Ceci réalise une échelle qui se projette sur l'écran et permet le repérage des stries. 2° Comme les rayons traversant une zone frontière sont infléchis, la position de la strie lumineuse sur l'écran est différente de la position qui correspondrait à une simple projection de la frontière. Pour obvier à cet inconvénient, on dispose près du tube laboratoire un cadre coulissant parallèlement à ce tube et portant un tube fin, tendu horizontalement. On déplace le cadre jusqu'à ce que l'image du fil sur l'écran se superpose à la strie lumineuse et l'on repère, sur l'échelle, l'ombre du fil, dont la position correspond à une projection vraie. Le fil permet, en outre, une vérification de l'existence d'une frontière peu nette, car l'image du fil, formée par les rayons qui ont traversé le tube, est décalée par rapport à l'ombre du fil qui se forme à côté, sur l'échelle, par simple projection. Le décalage est net et si l'on fait mouvoir lentement le fil, on note un saut de l'image lorsque l'on passe devant une frontière. Il ne s'agit pas seulement d'un saut, il y a diminution de l'obscurité produite par le fil, ce qui rend très nette la détermination de l'instant du passage du fil mobile, en face de la frontière.

MÉTHODES STATISTIQUES DE TITRAGE DES ULTRAVIRUS

par P. BONÉT-MAURY.

L'étude du titrage des ultravirus pathogènes, c'est-à-dire de la mesure d'une virulence, nous a amené à rapprocher assez étroitement les notions de toxicité et de virulence. Ce rapprochement, susceptible de justifications théoriques qui ne peuvent être développées ici, paraît déjà assez bien fondé sur la grande analogie des courbes expérimentales de toxicité et de virulence, obtenues par la méthode des dilutions.

En effet, si l'on injecte à des animaux groupés en lots d'importance égale des dilutions successives d'un virus susceptible de provoquer une infection mortelle, on observe, comme on le sait des mortalités régu-

lièrement décroissantes avec la dilution ; si l'on construit la « courbe de virulence, » liant la mortalité à la dilution, on obtient une courbe en S (fig. 1, courbes en pointillé) tout à fait voisine des courbes caractéristiques de toxicité (1).

Pour les toxiques on admet que cette forme traduit simplement l'inégale résistance des animaux-réactifs à l'intoxication et une courbe en S est considérée comme la courbe intégrale d'une courbe en cloche de Gauss, représentant la distribution d'un caractère biologique bien

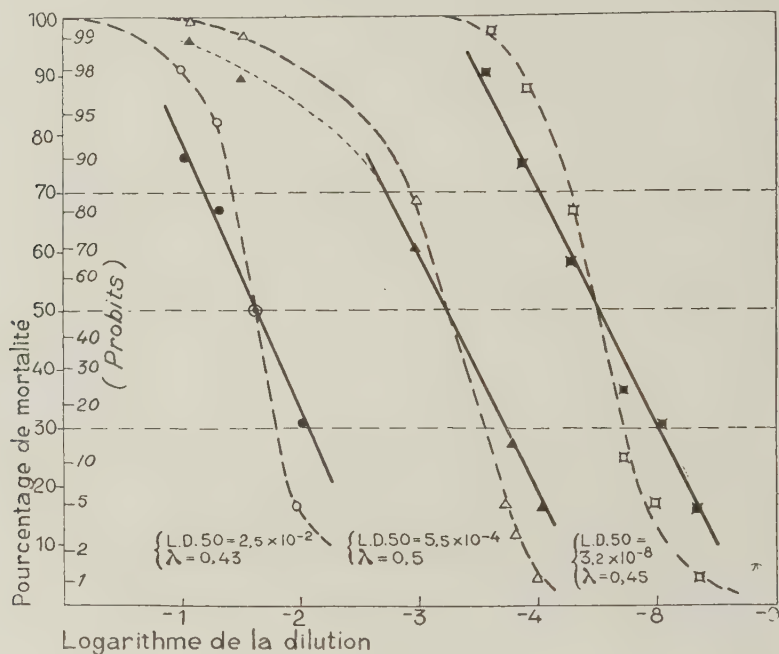


FIG. 1. — Courbes de virulence

L. D. 50 = $2,5 \times 10^{-2}$: poliomyélite (souris); L. D. 50 = $5,5 \times 10^{-4}$: herpès (souris);
L. D. 50 = $3,2 \times 10^{-8}$: vaccine (lapin). D'après Parker.

défini de la population d'animaux, c'est-à-dire leur résistance. Il paraît raisonnable d'interpréter de la même façon la forme des courbes de virulence, que nous avons observées avec A. Vaisman, au laboratoire de M. C. Levaditi (fig. 1). Nous avons vérifié, pour le virus herpétique inoculé à la souris (2), que les résistances individuelles mesurées par

(1) a) L. LAUNOY, *Leçons de Pharmacodynamie : la Toxicité*. Baillière, 1942; b) RÉGNIER, LAMBIN et SZOLLOSI, *Bull. Sci. Pharmacol.*, 1937, **44**, 81; c) TRÉVAN, *Proceed. Roy. Soc. Biol.*, 1927, **101**, 483; d) GRAY, TRÉVAN, BAINBRIDGE et ATTWOOD, *Proceed. Roy. Soc. Biol.*, 1934, **108**, 54; e) GADDUM, *Medical Research Council Spec. Report*, 1933, **183**; f) BLISS, *Quarterly J. Pharmacol.*, 1938, **11**, 192.

(2) BONÉT-MAURY, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **85**, 385.

le temps de survie, se distribuait bien suivant une courbe de Gauss, le χ^2 observé ayant une probabilité ($P = 0,13$) tout à fait naturelle. Nous avons été ainsi amené à appliquer au titrage des ultravirus les méthodes statistiques de la toxicologie.

La toxicité d'une substance médicamenteuse est complètement décrite par la courbe dose-mortalité, qu'il est avantageux de construire en coordonnées semi-logarithmiques (1 e). Une telle courbe est complètement caractérisée par deux valeurs : la *dose léthale 50 p. 100* (DL 50 ou dose provoquant la mortalité de la moitié des animaux) et la *pente λ* de la partie médiane de la courbe, pente qui traduit la dispersion des résistances individuelles autour de leur valeur moyenne. Cette pente se mesure directement sur le graphique en prenant la demi-distance des abscisses des points 16 p. 100 et 84 p. 100; statistiquement elle correspond à la déviation standard du logarithme des doses effectives individuelles et son inverse b est le coefficient de régression de la mortalité sur la dose. Par analogie avec les toxiques, il paraît donc logique de caractériser une courbe de virulence par les deux mêmes valeurs : la D. L. 50 [déjà proposée par Parker pour le virus vaccinal (3)] et le coefficient λ , caractérisant l'uniformité du matériel animal. Il est important de remarquer que la définition de ces deux grandeurs, directement mesurables à partir de l'expérience, ne fait appel à aucune hypothèse, bien que leur choix se justifie par des raisons statistiques sérieuses.

Mesures du titre d'un virus pathogène. — La détermination complète de la courbe de virulence, longue et coûteuse en animaux, n'est nullement nécessaire pour réaliser un bon titrage; seule sa partie médiane est utile. Les différentes méthodes statistiques de la Toxicologie s'efforcent d'obtenir une bonne détermination de D. L. 50 et de λ , avec un nombre d'animaux réduit au strict minimum. La méthode des accumulations de Dragstedt-Lang permet de réaliser une première économie en faisant figurer chaque animal dans le bilan de plusieurs dilutions. Une deuxième simplification importante est réalisée par un simple changement d'échelle, couramment utilisé en toxicologie (1 e). En exprimant les mortalités, non en pourcentages, mais avec une unité particulière, la déviation normale équivalente ou probit (*probability unit*), les courbes de toxicité obtenues deviennent généralement rectilignes dans leur partie médiane; deux points expérimentaux suffisent alors parfaitement pour déterminer de façon tout à fait satisfaisante D. L. 50 et λ . En appliquant ce changement d'échelle à nos courbes de virulence, nous avons constaté qu'on obtenait bien des droites, ce qui renforce encore l'analogie des courbes de virulence et de toxicité (fig. 1, courbes en traits pleins).

La précision d'un titrage est d'autant meilleure que le nombre d'animaux employé pour chaque dilution est plus élevé; des raisons impérieuses d'économie obligent par ailleurs à le réduire au minimum. Avec A. Vaisman, nous utilisons, en général, des séries de 10 animaux (souris) pour chaque dilution et 3 dilutions au 1/10 (4), soit

(3) PARKER, *J. exper. Med.*, 1938, 4, 67, 725.

(4) La première dilution, ou dilution 10 —¹, correspond à une suspension au 1/10 de cerveau de souris infectée.

30 animaux pour un titrage ; théoriquement 2 dilutions seraient suffisantes, si on connaissait la valeur approximative de la D. L. 50, avec trois dilutions on l'encadre plus sûrement, car on ne peut prévoir exactement sa valeur. Après un temps convenable pour amener la mort des animaux les plus résistants, et vérification histologique, les pourcentages de mortalité sont calculés pour chacune des 3 dilutions, en accumulant les résultats observés dans les deux autres. Les pourcentages ainsi calculés sont soit transformés en probits, à l'aide de tables (1 f), soit portés sur un papier spécial (logarithm. probability paper) dont les abscisses sont logarithmiques et les ordonnées exprimées en probits (fig. 1). On trace la droite passant convenablement entre les points expérimentaux et on détermine graphiquement la D. L. 50 et λ (5). Des méthodes statistiques assez laborieuses permettent d'obtenir de meilleures estimations de ces deux valeurs (1 c. f.) : le gain réalisé, de l'ordre de quelques pour 100, ne nous paraît pas justifier la perte de simplicité et de rapidité sur la simple méthode graphique, pratiquement très satisfaisante. Le calcul de la déviation standard de la D. L. 50 est possible, mais assez laborieux, cette déviation ne pouvant malheureusement pas être obtenue par une méthode graphique simple.

Il est possible d'imaginer d'autres méthodes de titrage : il suffit de mettre en évidence une corrélation suffisante entre la dilution virulente inoculée et un critère mesurable de la sévérité de l'infection : par exemple, élévation de température, survie, etc. C'est ainsi que le temps d'incubation après l'injection est sensiblement proportionnel au *log.* de l'inverse de la dilution pour le papillome de Shope (6) et pour le virus herpétique (2). La surface de la papule vaccinale paraît liée également à la dilution et cette corrélation permet, en introduisant le temps d'incubation, d'obtenir une méthode de titrage acceptable.

Conclusion. — L'application au titrage des ultravirus pathogènes des méthodes statistiques de la toxicologie permet d'obtenir une meilleure précision, tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux dépensés.

(Institut du Radium. Laboratoire Curie et Institut Alfred-Fournier.
Service de M. C. Levaditi.)

(5) La comparaison des valeurs obtenues montre que si les D. L. 50 sont différentes pour les 3 virus, l'uniformité λ des animaux est sensiblement la même pour chacun d'eux, les trois courbes ayant la même pente, sensiblement.

(6) BRYAN et BÉART, *J. inf. Dis.*, 1939, **65**, 306.

RECHERCHES SUR LA STABILITÉ DES LIAISONS ENTRE AGGLUTININES ET BACTÉRIES CAS DU *BACILLUS TYPHI-MURIUM* ET DES AGGLUTININES SPÉCIFIQUES DU SÉRUM DE LAPIN IMMUNISÉ

par MICHEL MACHEBOEUF et MAX VISCONTINI.

On est parvenu, dans divers cas, à dissocier le complexe antigène-anticorps [(1, 2, 3, 4, etc.)], mais les essais portèrent surtout sur des précipitines, des hémolysines ou des antitoxines. Nous avons examiné le cas des agglutinines.

1° *Action de l'eau distillée.* — On sait que l'agglutination ne se produit qu'en présence d'électrolytes. Si l'on élimine ensuite les sels, l'agglutination disparaît. On pouvait donc penser que l'eau distillée était capable d'éluer les agglutinines en dissociant l'union entre antigène et anticorps. Il n'en est rien, même dans le cas que nous avons choisi, pour lequel l'agglutinine appartient à la fraction pseudoglobulines (soluble dans l'eau pure). Les traitements répétés par l'eau distillée n'enlèvent pas d'agglutinines, car les eaux de lavage concentrées par dialyse sous pression n'ont pas de pouvoir agglutinant. D'ailleurs, après ces lavages, les microbes s'agglutinent encore spontanément si on les place dans de l'eau salée à 9 p. 1.000 ou dans les solutions isotoniques de divers sels (Ca Cl_2 , CuCl_2 , $(\text{NO}_3)_2\text{Ni}$, Oxalate de Na, SO_4 Mg).

2° *Action des solutions salées très concentrées.* — Heidelberger, Kendall et Teorell (4) ont pu dissocier le complexe antigène-anticorps, dans le cas de polyosides pneumococciques, par action d'une solution de chlorure de sodium très concentrée. Nous avons constaté qu'une telle solution (15 p. 100) est incapable de détacher les agglutinines des bacilles que nous étudions (le liquide obtenu par trois lavages successifs n'a pas de pouvoir agglutinant, même lorsque, par dialyse sous pression, on l'a concentré considérablement et rendu isotonique).

3° *Action des amino-acides.* — On sait que les anticorps sont des protéides. On pouvait donc penser que les groupements chimiques qui interviennent dans leur liaison avec les antigènes sont simplement certains de ceux que l'on rencontre dans les amino-acides. S'il en était bien ainsi, certains amino-acides devraient être les agents électifs pour dissocier le complexe antigène-anticorps, chaque amino-acide tendant, par action de masse, à prendre la place sur l'antigène du groupement

(1) RAMON, *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 167.

(2) EULER et BRUNIUS, *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1930, **68**, 124.

(3) FELTON, *J. Immunol.*, 1931, **21**, 357 et 1932, **22**, 453.

(4) HEIDELBERGER, KENDALL et TEORELL, *J. exper. Med.*, 1936, **63**, 819.

correspondant de l'anticorps. D'ailleurs, Euler et Brunius (2) ont autrefois constaté la dissociation d'un complexe hématies-hémolysines sous l'action de solutions assez concentrées de glycolle.

Nous avons tenté de détacher les agglutinines des microbes que nous étudions en faisant agir une solution neutre contenant 70 g. par litre du mélange d'amino-acides obtenu par hydrolyse chlorhydrique d'euglobulines de sérum de Cheval (la majeure partie de l'acide chlorhydrique avait été éliminée par distillation sous vide et le reste neutralisé par la soude. La concentration en NaCl était finalement amenée à 9 p. 1.000). La solution d'amino-acides n'arrache pas les agglutinines car si, après l'avoir séparée des microbes, on élimine les amino-acides et concentre par dialyse sous pression, on obtient une solution qui n'a pas de pouvoir agglutinant. D'ailleurs, les microbes lavés par la solution d'amino-acides, restent agglutinés. Notons, il est vrai, que certains amino-acides que détruit l'hydrolyse acide des protéides et particulièrement le tryptophane, n'étaient pas présents dans la solution utilisée qui contenait, par contre, leurs produits de décomposition.

Nos expériences mettent en évidence la remarquable stabilité de l'union entre microbes et agglutinines. Cette union n'est pas dissociée par divers agents, qui, cependant, dissocient d'autres complexes antigène-anticorps. Notons que nous avons toujours opéré avec des complexes microbe-anticorps obtenus en mettant, en présence des microbes, la quantité minima d'anticorps, nécessaire pour obtenir l'agglutination totale ; il se peut que les résultats eussent été différents s'il y avait eu un excès d'anticorps.

(Institut Pasteur, Paris.)

ÉTUDES SUR LE POUVOIR ANTISULFAMIDE

VI. — INFLUENCE DE LA DIAZOTATION SUR LE POUVOIR ANTISULFAMIDE DES AUTOLYSATS DE LEVURE

par J. TABONE, F. NITTI et H. MOUSSET.

Nous avons montré dans une note précédente (1) qu'il fallait rechercher la source principale de l'activité antisulfamide des peptones ailleurs que dans la présence éventuelle, dans celles-ci, de faibles quantités d'acide *p*-aminobenzoïque. Dans la note présente nous nous sommes proposé de rechercher si l'acide *p*-aminobenzoïque, contenu dans les autolysats de levure (2), était le seul facteur responsable de l'activité antisulfamide de ces derniers.

Nous avons pensé qu'un moyen d'atteindre ce but était de diazoter les solutions d'autolysat de levure et de décomposer ensuite, par chauff-

(1) J. TABONE, F. NITTI et H. MOUSSET, *Ass. Micr. L. Franç.*, ces *Annales*, 1942, **68**, 472.

(2) Woods, *Brit. J. exp. Pathol.*, 1940, **21**, 74.

fège modéré (quelques minutes à 100°), les sels de diazonium ainsi formés. On sait que dans ces conditions l'acide *p*-aminobenzoïque perd quantitativement son activité antisulfamide (1).

Pour la diazotation, la détermination du pouvoir antisulfamide et le dosage des fonctions amines aromatiques, voir (1).

Les résultats obtenus sont les suivants : une solution diluée (3) d'autolysat de levure perd, après diazotation, le quart et parfois la moitié de son pouvoir antisulfamide. La même solution à laquelle on a précédemment ajouté de l'acide *p*-aminobenzoïque voit, du fait de la diazotation, son pouvoir antisulfamide baisser considérablement et prendre une valeur sensiblement identique à celle que prend la solution d'autolysat seule après diazotation. L'une et l'autre solution donnent, après qu'elles aient été diazotées, une réaction de Marshall négative.

Ces faits nous permettent de penser que pratiquement la totalité des fonctions amines aromatiques est détruite au cours de la diazotation. De sorte que la baisse du pouvoir antisulfamide des autolysats observée après diazotation peut être attribuée à la disparition des fonctions amines aromatiques qu'ils renferment et fort probablement à celle de l'acide *p*-aminobenzoïque.

Les résultats de nos expériences s'expliquent donc à la lumière des faits déjà acquis, à savoir l'existence dans les autolysats de levure, d'acide *p*-aminobenzoïque. Ils montrent de plus qu'il existe dans les autolysats de levure des facteurs antisulfamides autres que l'acide *p*-aminobenzoïque. On poursuit l'étude de ces nouveaux facteurs.

(Institut Pasteur.)

ACTION DU *p*-AMINO-PHÉNYL-SULFAMIDE DANS LE SODOKU EXPÉRIMENTAL DU COBAYE

par F. NITTI, F. BOYER et M. CONGE.

Le sulfamide, qui s'est montré d'une si grande polyvalence antimicrobienne, ne manifeste qu'une action très limitée ou nulle dans la plupart des infections parasitaires.

Récemment Ishii, Schumizu et Tsuda ont montré que la spirochétose récurrente expérimentale de la souris peut être favorablement influencée par ce médicament. Dans la syphilis, par contre, le sulfamide s'est montré absolument inopérant.

Nous avons essayé l'action thérapeutique du *p*-amino-phényl-sulfamide dans le sodoku du cobaye.

Nous nous sommes servis, dans nos expériences, d'une souche de sodoku isolée chez l'homme par notre maître Salimbeni et entretenue par passages sur l'animal au laboratoire.

L'inoculation a été pratiquée avec une émulsion de rate broyée qui

(3) Les solutions soumises au dosage biologique renferment 2,58 g. de matières sèches pour 100 c. c.

se montre, comme l'avait décrit M. Salimbeni, extrêmement infectante pour le cobaye.

L'inoculation, pratiquée par la voie sous-dermique sur le flanc épilé du cobaye, est suivie cinq ou six jours après par une adénopathie inguinale, puis par un chancre au lieu d'inoculation. En même temps, de rares spirilles apparaissent dans le sang. Laissée à elle-même l'infection évolue rapidement, le nombre des spirilles augmente, des troubles trophiques apparaissent : chute des poils, atrophie des organes génitaux, effondrement des cartilages du nez. Puis la mort survient entre le trentième et le quarantième jour.

Nous avons suivi trois séries d'animaux, les premiers traités par du novarsénobenzol, les seconds par le sulfamide et les derniers enfin non traités et servant de témoins.

Il est connu que le novarsénobenzol jugule rapidement le sodoku expérimental. Il est à noter qu'il faut utiliser des doses relativement élevées et des injections répétées. Un traitement unique de novarsénobenzol à la dose de 30 mg. seulement par kilogramme est généralement suivi d'une rechute.

Le *p*-amino-phényl-sulfamide à des doses très élevées, il est vrai, s'est montré très actif dans le sodoku expérimental du cobaye.

Les animaux ont été traités six jours après l'inoculation, dès l'apparition de spirilles dans le sang circulant.

Le sulfamide s'élimine très rapidement lorsqu'il est administré par la voie buccale. Pour obvier à cet inconvénient, nous avons introduit sous la peau des cobayes des crayons de sulfamide, cette méthode permettant une résorption relativement plus lente du médicament.

Un traitement unique à la dose de 3 g. par kilogramme amène en quelques jours, ou plus souvent en vingt-quatre heures, la disparition des spirilles dans le sang. La guérison n'est qu'apparente car dans la plupart des cas une rechute se produit vers le vingtième jour.

Un traitement répété deux fois, à une semaine d'intervalle, à la dose de 1,50 g. par kilogramme, amène par contre des guérisons durables. Les animaux restent parfaitement normaux, les poils dans la région épilée repoussent, les organes génitaux ne présentent aucun signe d'atrophie, les testicules restent mobiles.

En résumé, le *p*-amino-phényl-sulfamide exerce une action thérapeutique extrêmement nette dans une infection spirillaire particulièrement sévère du cobaye.

(Institut Pasteur.)

Le Gérant : G. MASSON.